



**NELMA FERREIRA DE PAULA VICENTE**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE  
EXTRATOS DE *Pereskia grandifolia* Haw**

**LAVRAS – MG  
2017**

**NELMA FERREIRA DE PAULA VICENTE**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Pereskia  
Grandifolia* Haw**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção de título de Mestre.

Orientador  
Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa  
Coorientadora  
Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

**LAVRAS – MG  
2017**

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha  
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados  
informados pelo(a) próprio(a) autor(a).**

Vicente, Nelma Ferreira de Paula.

Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de  
*Pereskia Grandfolia* Haw / Nelma Ferreira de Paula Vicente. -  
2017.

57 p.

Orientador(a): Raimundo Vicente de Sousa.

.  
Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de  
Lavras, 2017.

Bibliografia.

1. Fitoterápico. 2. Ora-pro-nóbis. 3. Antioxidante. I. Sousa,  
Raimundo Vicente de. . II. Título.

**NELMA FERREIRA DE PAULA VICENTE**

**ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E ANTIMICROBIANA DE EXTRATOS DE *Pereskia Grandfolia* Haw**

**ANTIOXIDANT AND ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF EXTRACTS OF *Pereskia Grandfolia* Haw**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, para a obtenção de título de Mestre.

APROVADA em 6 de março de 2017.

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa

UFLA

Profa.Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli

UFLA

Profa. Dra. Ana Cardoso Clemente Filha Ferreira de Paula

IFMG - Bambuí

Prof. Dr. Raimundo Vicente de Sousa  
Orientador

Profa. Dra. Roberta Hilsdorf Piccoli  
Coorientadora

**LAVRAS – MG  
2017**

*Aos meus pais, Egidio e Nazaré; ao meu esposo, Carlos Alberto Vicente; aos meus filhos,  
Carlos Leonardo de Paula Vicente, Helder de Paula Vicente e Júlia de Paula Vicente, e a  
todos os irmãos e familiares*

*Dedico*

## AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, por iluminar meus passos e me dar forças para seguir em frente, mesmo nos momentos mais difíceis.

À minha família, pelo apoio e incentivo. A todos os familiares, por estarem sempre ao meu lado.

Ao meu orientador, Raimundo Vicente de Sousa, e à pesquisadora Ana Cardoso Clemente, pela motivação e contribuição com o trabalho.

À professora Roberta, que lida com sua equipe de maneira única e deixa um modelo de profissional, mãe, mulher e ser humano, por aceitar a coorientação, pelos ensinamentos valiosos transmitidos, pela confiança depositada em mim e pela compreensão, paciência, incentivo e amizade.

Aos coordenadores e professores do curso de Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, cujos preciosos ensinamentos profissionais me foram transmitidos.

Ao meu irmão Nélio, pelas contribuições e disponibilizar o seu tempo nos finais de semana.

Aos técnicos e funcionários da Universidade Federal de Lavras, de maneira geral e, carinhosamente, gostaria de agradecer a Anete (Fitoquímica) e a Eliane (Microbiologia de alimentos), pela disponibilidade de contribuir com este trabalho e aos funcionários do horto de plantas medicinais, Dico, Giulia e Paulo.

Ao Diogo, pelas contribuições nas análises estatísticas; à Heloísa, pela parceria nos trabalhos de laboratório; à Sâmia, por contribuir com as análises cromatográficas e à Nelma Oliveira, pela disponibilidade e contribuições.

Aos colegas e amigos, pelo companheirismo e agradável convívio durante a realização dos experimentos.

À Universidade Federal de Lavras (UFLA) e ao Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares, pela oportunidade de cursar o mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo apoio financeiro na realização do experimento; à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

A todos que contribuíram para que este trabalho fosse realizado, **MUITO OBRIGADA!**

*O homem depende do seu pensamento*

*Mokiti Okada*

## RESUMO

A pesquisa de novos agentes antimicrobianos se faz necessária devido ao surgimento de microrganismos resistentes. Assim, há a necessidade de agentes que tenham mecanismos de ação diferentes aos fármacos e que possam contribuir significativamente para o desenvolvimento do campo da saúde em nível mundial, objetivando encontrar substâncias mais eficazes e menos tóxicas. Sabe-se que algumas substâncias produzidas pelas plantas podem ter ação no organismo humano e, se utilizadas de maneira correta, podem atuar com benefícios medicinais, seja preventivo, paliativo ou curativo. Dentre tantas espécies vegetais que são pouco estudadas quanto às suas atividades antioxidantes e biológicas, *Pereskia grandifolia* Haw., pertencente à família Cactaceae, conhecida popularmente como ora-pro-nóbis, se destaca por apresentar propriedades terapêuticas e nutricionais conhecidas. Diante do exposto, o trabalho foi realizado com objetivo de avaliar a atividade de extratos de *Pereskia grandifolia* Haw., obtidos por métodos diferentes de extração, em relação a análises fitoquímicas e biológicas sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*. As plantas de *Pereskia grandifolia* Haw. foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras e em suas folhas foi determinado o teor de umidade. Foram preparados os extratos aquoso de refluxo, aquoso de sonicação, etanólico de refluxo e etanólico de sonicação, e, posteriormente, determinado o pH dos extratos, bem como o rendimento extrativo. Para avaliar a atividade antioxidante dos extratos foram realizadas análises como determinação de fenóis totais, quantificação de flavonoides totais e quantificação dos di-hidroflavonoides totais. A capacidade antioxidante total foi observada por meio do sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH), bem como a determinação de poder quelante e a determinação de poder redutor. A quantidade de fenóis totais nos extratos examinados variou de  $0,63 \pm 0,47$  a  $9,88 \pm 4,25$  mg EAG/g planta seca. Os resultados indicaram que a maior recuperação de flavonas e flavonóis totais foi obtida por refluxo com etanol a 70% ( $0,57 \pm 0,11$  mgQE/g folha seca), seguida pelo solvente água ( $0,26 \pm 0,11$  mgQE/g folha seca). As concentrações de flavanonas/di-hidroflavonóis totais variou de acordo com o solvente e o método utilizado para a extração. A quantidade variou de  $4,04 \pm 2,16$  a  $15,27 \pm 3,26$  mg NE/g folha seca. Para avaliar a atividade antibacteriana *in vitro* dos extratos de *Pereskia grandifolia* Haw. Sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* foi determinada a concentração mínima bactericida (CMB) e a sensibilidade a antibióticos. Todos os extratos obtidos da *Pereskia grandifolia* Haw. foram inibitórios para os microrganismos estudados, sendo o aquoso obtido por refluxo e, por sonicação, os que apresentaram maior halo de inibição. No entanto, quando determinada a CMB, apenas o extrato etanólico de ora-pro-nóbis foi eficaz. Os resultados deste estudo apontam a eficácia da atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro* dos diferentes extratos obtidos da *Pereskia grandifolia* Haw., reforçando a importância medicinal desta espécie e incentivando a busca por novos estudos.

**Palavras-chave:** Fitoterápico. Ora-pro-nóbis. Antioxidante. Patógenos. Antimicrobiano natural.

## ABSTRACT

The research of new antimicrobial agents is necessary due to the emergence of resistant microorganisms. Thus, there is a need for agents that have mechanisms of action different from drugs and that can contribute significantly to the development of health worldwide, with the objective of finding more effective and less toxic substances. It is known that some substances produced by plants can have action in the human body and, if used correctly, can act with medicinal benefits, be they preventive, palliative or curative. Among so many plant species that are little studied in relation to antioxidant and biological activities, *Pereskia grandifolia* Haw. belonging to the family Cactaceae, popularly known as ora-pro-nobis, stands out for having known therapeutic and nutritional properties. The objective of this work was to evaluate the activity of extracts of *Pereskia grandifolia* Haw. obtained by different methods of extraction in relation to phytochemical and biological analyzes on *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. As *Pereskia grandifolia* Haw. were collected in the Medicinal Plants Garden of the Federal University of Lavras and in the leaves the moisture content was determined. The aqueous refluxing, sonication, ethanolic refluxing and ethanolic sonication extracts were made and subsequently the pH of the extracts and the extractive yield were determined. To evaluate the antioxidant activity of the extracts were carried out analyzes such as determination of total phenols, quantification of total flavonoids, and quantification of total dihydroflavonoids. In addition to these analyzes, total antioxidant capacity was observed by sequestration of the 2,2-diphenyl-1-picryl-hydrazyl (DPPH) free radical and the chelating power and reducing power were determined. To evaluate the *in vitro* antibacterial activity of extracts of *Pereskia grandifolia* Haw. against *Pseudomonas aeruginosa* and *Staphylococcus aureus* the Minimum Bactericidal Concentration (CMB) and sensitivity to antibiotics were determined. In relation to the phytochemical analyzes, the ethanol extract obtained by reflux showed a higher amount of phenols and flavonoids and a better antioxidant capacity. And in relation to the antibacterial activity all the extracts obtained from *Pereskia grandifolia* Haw. inhibited the growth of the microorganisms. Aqueous reflux and sonication extract shows greater inhibition halo. However, when the CMB was determined only the ethanolic extract of ora-pro-nobis was effective. The results of this study indicate the effectiveness of the antioxidant and antibacterial activity of the different extracts obtained from *Pereskia grandifolia* Haw. reinforcing the medicinal importance of this species, and encouraging the search for new studies.

**Keywords:** Phytotherapeutic. Ora-pro-nobis. Antioxidant. Pathogens. Natural Antimicrobial.

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	11
2	OBJETIVOS .....	13
2.1	Objetivo geral .....	13
2.2	Objetivos específicos.....	13
3	REFERENCIAL TEÓRICO .....	14
3.1	<i>Pereskia</i> sp. ....	14
3.2	Química da <i>Pereskia</i> spp.....	14
3.3	<i>Pereskia grandifolia</i> Haw. ....	16
3.4	Plantas medicinais e metabólitos secundários .....	17
3.5	Compostos fenólicos .....	18
3.6	Flavonoides.....	19
3.7	Atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos de plantas medicinais: <i>Pereskia</i> sp. ....	21
3.8	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> .....	23
3.9	<i>Staphylococcus aureus</i> .....	24
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	25
4.1	Coleta e identificação do material botânico .....	25
4.2	Determinação da umidade .....	25
4.3	Preparo dos extratos .....	25
4.4	Determinação do rendimento extrativo.....	25
4.5	Determinação do pH .....	26
4.6	Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de <i>P. grandifolia</i> Haw. ....	26
4.6.1	Reagentes e equipamentos .....	26
4.6.2	Determinação dos fenóis totais .....	26
4.6.3	Quantificação flavonoides (flavonas e flavonoides totais) .....	27
4.6.4	Quantificação de flavonas e di-hidroflavonóis totais .....	27
4.6.5	Capacidade antioxidante total.....	28
4.6.6	Determinação do poder quelante .....	28
4.6.7	Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH) .....	28
4.6.8	Determinação do poder redutor.....	29
4.7	Perfil cromatográfico dos extratos.....	29
4.8	Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de <i>Pereskia grandifolia</i> .....	30
4.8.1	Microrganismos e obtenção do inóculo .....	30
4.8.2	Sensibilidade a antibióticos.....	30
4.8.3	Atividade antimicrobiana dos extratos de <i>P. grandifolia</i> .....	31
4.8.4	Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos extratos .....	31
4.9	Análise estatística .....	31
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	32
5.1	Cálculo de umidade .....	32
5.2	Rendimento extrativo.....	32
5.3	Determinação do pH .....	32
5.5	Quantificação de compostos fenólicos e atividades antioxidantes dos extratos....	33
5.6	Fenólicos totais.....	33
5.7	Flavonas e flavonóis totais .....	34
5.8	Flavanonas e di-hidroflavonóis totais .....	34
5.9	Atividade antioxidante .....	35
5.10	Capacidade antioxidante total.....	36
5.11	Atividade captadora de radical livre de DPPH .....	36

5.12	Poder quelante .....	36
5.13	Poder redutor.....	37
5.14	Perfil cromatográfico .....	38
5.15	Sensibilidade a antibióticos.....	40
5.16	Atividades biológica dos extratos de <i>Pereskia grandifolia</i> Haw. ....	41
5.16.1	Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos extratos .....	42
6	CONCLUSÕES .....	44
	REFERÊNCIAS .....	45

## 1 INTRODUÇÃO

A ora-pro-nóbis pertence ao gênero *Pereskia* da família Cactaceae. *Ora pro nobis*, em latim, significa “rogai por nós” e é o nome popular das espécies *Pereskia aculeata* Mill. e *Pereskia grandifolia* Haword, planta rústica bastante conhecida na medicina popular brasileira como agente diurético (KAZAMA et al., 2012).

As folhas de ora-pro-nóbis não apresentam toxicidade e, devido ao seu elevado valor proteico, essa planta é denominada “carne de pobre” (ROCHA et al., 2008). Além do alto conteúdo proteico, também apresenta elevado teor de mucilagem, sendo suas folhas utilizadas como emoliente (DUARTE; HAYASHI, 2005; ROSA; SOUZA, 2003) e seus frutos como expectorante e antissifilítico (ROSA; SOUZA, 2003).

Apesar dos grandes avanços da medicina moderna, a medicina natural ainda é a opção para o tratamento de doenças da maioria da população dos países em desenvolvimento, principalmente devido aos princípios ativos antioxidantes presentes nas plantas. Antioxidantes são substâncias que podem prevenir, impedir ou reduzir danos oxidativos ao DNA, às proteínas e aos lipídeos. Eles atuam como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO) nocivas, causadoras da iniciação ou da progressão de doenças (DIPLOCK et al., 1998). O interesse por antioxidantes naturais tem aumentado consideravelmente, nos últimos anos, devido aos seus efeitos benéficos na prevenção e na redução do risco de várias doenças (SIGER et al., 2012).

As principais classes de antioxidantes que podem estar presentes naturalmente nos alimentos e nas plantas são os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, flavonoides e taninos), carotenoides, tocoferóis, ácido ascórbico e seus derivados (VELIOGLU et al., 1998; AMAROWICZ et al., 2004). Os componentes fenólicos presentes em plantas têm sido muito estudados por apresentarem atividades farmacológica, antinutricional, antioxidantes e antimicrobianas (NAGEM et al., 1992; GAMACHE et al., 1993; IVANOVA et al., 1997; AZIZ et al., 1998; FERNANDEZ et al., 1998; HOLLMAN, KATAN, 1998), além de participarem de processos responsáveis pela cor, a adstringência e o aroma em vários alimentos (PELEG et al., 1998).

Sabe-se que algumas substâncias produzidas pelas plantas podem ter ação no organismo humano e, se utilizadas de maneira correta, podem atuar com benefícios medicinais, sejam preventivos, paliativos ou curativos. Estas substâncias são denominadas princípios ativos e, na maioria das vezes, uma planta apresenta mais de um princípio ativo, o

que lhe confere diversas propriedades medicinais. No entanto, há um grupo de substâncias ativas que determina a sua ação principal, de forma que a planta medicinal, mesmo apresentando diversas propriedades, apresenta sempre uma que sobressai (LINK, LOPES, 2011).

Na literatura, existem diversos trabalhos nos quais se avaliou a atividade antioxidante e antimicrobiana de diferentes extratos vegetais. A utilização de extratos vegetais e plantas medicinais para humanos data de milhares de anos, sendo muito difundida no Egito Antigo, na China, na Índia e na Grécia (KAMEL, 2000). A eficiência da atividade biológica dos extratos vegetais depende da espécie utilizada, da concentração do princípio ativo presente na planta, da fonte de origem (caule, folhas ou semente), dos métodos de obtenção e da estabilidade dos componentes (KAMEL, 2000; BRUGALLI, 2003).

Diante do exposto, o presente trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o teor de compostos fenólicos e o potencial antioxidante e antimicrobiano, sobre *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*, de extratos de *Pereskia grandifolia* Haw.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral, neste trabalho, foi avaliar o teor de compostos fenólicos e o potencial antioxidante e antimicrobiano de extratos etanólicos e aquosos de *Pereskia grandifolia* Haw.

### 2.2 Objetivos específicos

Especificamente, os objetivos foram:

- preparar e determinar o pH dos extratos aquosos e etanólicos de *Pereskia grandifolia* Haw.;
- determinar o teor de compostos fenólicos, flavonoides e di-hidroflavonoides totais em extratos aquosos e etanólicos de *P. grandifolia*;
- avaliar a atividade antioxidante *in vitro* dos extratos aquosos e etanólicos de *P. grandifolia*;
- avaliar a atividade antimicrobiana dos extratos sobre *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* por meio da concentração mínima bactericida (CMB) e da sensibilidade a antibióticos.

### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 *Pereskia* sp.

*Pereskia* sp. tem origem em países latino-americanos, mas também está difundida em outras regiões tropicais, como Malásia, Índia, Indonésia e Panamá. No Brasil, pode ser encontrada da Bahia ao Rio Grande do Sul.

Este gênero apresenta 17 espécies, como *Pereskia grandifolia* Haw., *Pereskia aculeata*, *Pereskia aureiflora*, *Pereskia bahiensis*, *Pereskia bleo*, *Pereskia guamacho*, *Pereskia horrid*, *Pereskia lychnidiflora*, *Pereskia marcanoi*, *Pereskia nemorosa*, *Pereskia portulacifolia*, *Pereskia quisqueyana*, *Pereskias acharosa*, *Pereskia stenantha*, *Pereskia weberiana* e *Pereskia zinniiflora* (ABDUL-WAHAB et al., 2012, EDWARDS, DONOGHUE, 2006, PINTO, SCIO, 2014, SHARIF et al., 2015).

*P. grandifolia* é uma planta resistente e rústica que se desenvolve em diferentes tipos de solos. A espécie foi introduzida na África do Sul, pelo menos desde 1858. Seus frutos são empregados para fazer compotas e a planta também é utilizada como cobertura vegetal. Na região noroeste do estado do estado do Paraná, Brasil, ela frequentemente é encontrada como trepadeira em matas secundárias. É espécie desde heliófita até esciófita e seletiva xerófito, ocorrendo, preferencialmente, nas orlas e nas clareiras das florestas (PEREIRA et al., 2007).

Estes cactos são utilizados, tradicionalmente, não só para fins medicinais, mas também alimentares e ornamentais. Os frutos apresentam propriedade expectorante e antissifilítica. As folhas são empregadas como emoliente, anti-inflamatório e para a cicatrização de feridas (CARVALHO et al., 2014, KAZAMA et al., 2012). Além disso, *P. grandifolia* é utilizada para o tratamento de infecções em seres humanos (ZAREISEDEHIZADEH et al., 2014, SIEW et al., 2014, NURESTRI et al., 2009).

De acordo com estudos, as espécies do gênero *Pereskia* com potencial biologicamente ativos são *Pereskia aculeata*, *Pereskia bleo* e *Pereskia grandifolia*, conhecidas como ora-pro-nóbis (ZAREISEDEHIZADEH et al., 2014; NURESTRI et al., 2009).

#### 3.2 Química da *Pereskia* spp.

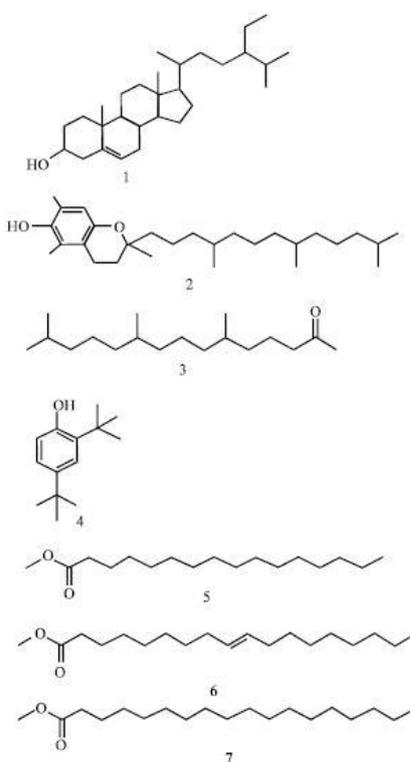
Os principais compostos fitoquímicos encontrados no gênero *Pereskia* são alcaloides, flavonoides, terpenos e taninos. Os flavonoides, como o flavonol-3-O-glicosídeos, quercetina, canferol, isoramnetina, flavonóis, di-hidroflavononóis e flavanonas, são responsáveis por uma

grande variedade de atividades biológicas atribuídas a espécies do gênero *Pereskia*. A quercetina é um potente antioxidante comumente encontrado em quantidades elevadas e, juntamente com o canferol, as antocianinas e as catequinas (ZAREISEDEHIZADEH et al. 2014).

Alguns compostos já foram identificados a partir do extrato metanólico das folhas de *Pereskia grandifolia* Haw., tais como  $\beta$ -Sitosterol (1), vitamina E (2), fitona (3), 2,4-di-tert-butilfenol (4), metilpalmitato (5), metiloleato (6) e metilestearato (7) (Figura1) (ZAREISEDEHIZADEH et al. 2014).

Em um estudo realizado por Agostini-Costa et al. (2012) foi demonstrado que os frutos de *Pereskia aculeata* são ricos em carotenoides, como  $\alpha$ -caroteno (22,7  $\mu\text{g/g}$ ),  $\beta$ -caroteno (34,3  $\mu\text{g/g}$ ), luteína (6,5 $\mu\text{g/g}$ ),  $\alpha$ -criptoxantina/zeinoxantina (2,7  $\mu\text{g/g}$ ) e  $\beta$ -criptoxantina (2,2  $\mu\text{g/g}$ ).

Figura 1 - Estruturas químicas dos compostos encontrados em *Pereskia grandifolia* Haw.:  $\beta$ -sitosterol (1), vitamina E (2), fitona (3), 2,4-di-tert-butiphenol (4), metilpalmitato (5), metiloleato (6) e metilstearate (7).



Fonte: Zareisedehizadeh et al. (2014)

### 3.3 *Pereskia grandifolia* Haw.

*P. grandifolia* Haw. é também conhecida como ora-pro-nóbis, cacto-rosa, jumbeba e rosa-madeira. Esta planta é nativa das restingas do nordeste do Brasil e é cultivada em regiões tropicais e áreas subtropicais. É uma planta arbórea ou arbusto, de 3m a 6m de altura, com tronco cinzento-castanho de até 20 cm de diâmetro, com vários espinhos grandes e pontiagudos em seus ramos, e com folhas grandes e suculentas. As folhas variam em tamanho de 9 a 23 cm de comprimento e suas formas variam de elíptica a ovadas e de obovadas a lanceoladas. Normalmente, desenvolvem 10-15 flores de densa inflorescência nas extremidades das hastes, mas, algumas vezes, podem ter 30 ou mais flores. As flores são de coloração rósea a roxo e têm de 3-5 de diâmetro. As folhas de *P. grandifolia* são comestíveis. Os frutos têm formato de baga e coloração verde-avermelhada, quando jovens (com presença de pequenas folhas na superfície), passando a verde-amarelada, quando se inicia a maturação (ZAREISEDEHIZADEH *et al.*, 2014). As estruturas da *Pereskia grandifolia* Haw. podem ser observadas na Figura 2.

*P. grandifolia* Haw. apresenta alto teor de mucilagem, sendo empregada externamente como emoliente, na medicina popular e consumida como fonte alimentar, podendo ser utilizada no tratamento e na prevenção de patologias relacionadas a deficiências nutricionais, especialmente as proteicas (FARAGO *et al.*, 2004, SOBRINHO *et al.*, 2015). Em virtude da presença do biopolímero arabinogalactana e do elevado conteúdo proteico nas folhas, essas plantas têm despertado o interesse da indústria alimentícia e da farmacêutica.

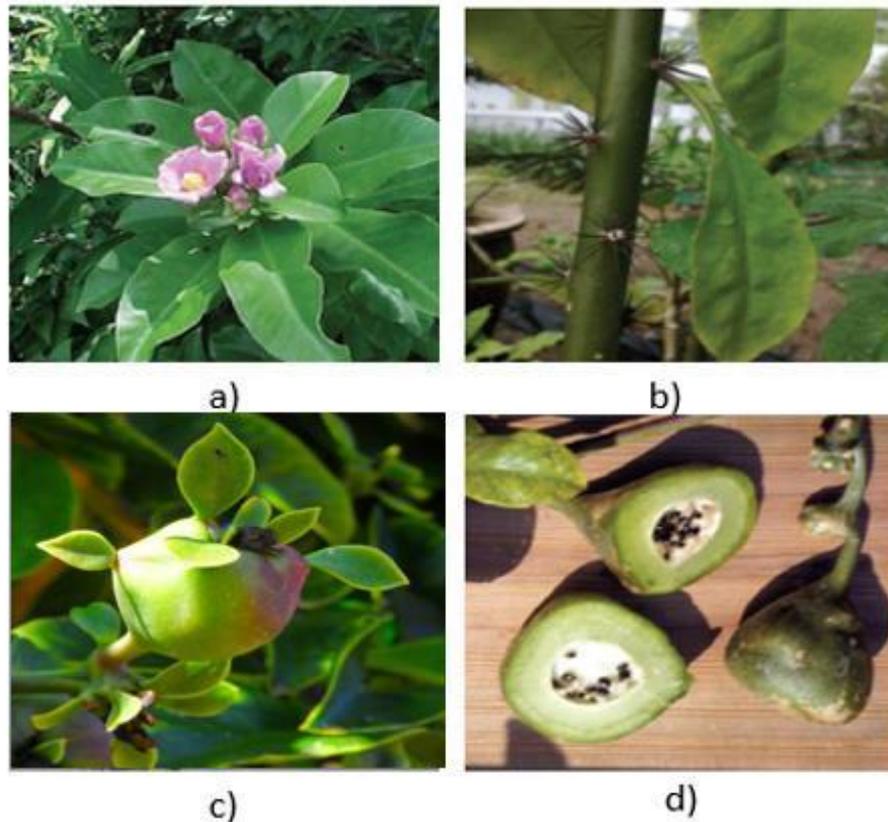
Há um fato interessante em relação à sua propriedade anticâncer, pois não se encontrou, cientificamente, toxicidade contra as células normais (CONCEIÇÃO *et al.*, 2014). Além disso, nos frutos pode ser encontrado  $\beta$ -caroteno (SOUZA *et al.*, 2013). Na medicina tradicional, as folhas da ora-pro-nóbis são empregadas na forma de chá, para o controle do diabetes ou, ainda, na preparação de emplastro no tratamento de infecções da pele (DUARTE; HAYSASHI, 2005; TURRA *et al.*, 2007, CORREA, ALMEIDA, 2012, ZAREISEDEHIZADEH *et al.*, 2014).

*Pereskia grandifolia* Haw. é consumida, principalmente, no estado de Minas Gerais, sendo, no município de São Gonçalo do Abaeté, mais comumente encontrada e conhecida do que a *P. aculeata*. No semiárido brasileiro, suas folhas e frutos são utilizados na culinária. A ausência de toxicidade de suas folhas e a riqueza de nutrientes a tornam importante na

alimentação humana na cidade de São Gonçalo do Abaeté (MG), tanto na prevenção quanto no tratamento de doenças (ALMEIDA *et al.*, 2014). A ora-pro-nóbis é uma hortaliça não convencional consumida pelas populações rurais e urbanas, e contribui para complementar a alimentação e a economia familiar (TAKEITI *et al.*, 2009, ALMEIDA *et al.*, 2014)

Mesmo sendo pouco estudada, sabe-se que a ora-pro-nóbis apresenta de 28% a 32% de teor proteico e 85% de digestibilidade, além de elevados valores de aminoácidos essenciais, destacando-se lisina, leucina e valina, podendo, assim, demonstrar aplicação farmacológica no tratamento e na prevenção de enfermidades relacionadas a deficiências proteicas (TAKEITI *et al.*, 2009, ALMEIDA *et al.*, 2014).

Figura 2 - Estruturas da *Pereskia grandifolia* Haw.: a) flores; b) folha e espinhos; c) fruto fechado; d) fruto aberto.



Fonte: Zareis e dehizadeh et al. (2014)

### 3.4 Plantas medicinais e metabólitos secundários

De acordo com Lopes et al. (2005), planta medicinal é toda planta que, administrada ao homem ou animal, por qualquer via ou forma, exerça alguma ação terapêutica. Metabólitos secundários ou fitoquímicos naturais são substâncias produzidas em pequenas quantidades e

que nem sempre estão envolvidos em funções vitais do vegetal ou, mesmo, presente em todos eles. São conhecidos por serem sintetizados em tipos celulares especializados e em distintos estágios de desenvolvimento, tornando seu isolamento e purificação mais trabalhosos. A produção desses componentes tem como função proteger a planta contra herbívoros e o ataque de patógenos (SIMÕES et al., 2010).

Efetivamente, as plantas são uma fonte natural de compostos bioativos (metabólitos secundários), incluindo antioxidantes, como os compostos fenólicos (ácidos fenólicos, taninos, flavonoides, cumarinas e estilbenos), vitaminas, carotenoides, alcaloides, entre outros, com diversas ações na promoção da saúde (LOZIENE et al., 2007).

Os metabólitos secundários das plantas têm uma estrutura variável, sendo considerados multifuncionais. Estes compostos têm despertado interesse, mais recentemente, devido aos vários estudos que evidenciam o benefício do seu consumo para a saúde e a prevenção de doenças crônicas. Estes metabólitos secundários também têm sido associados a propriedades anticancerígenas, antiaterogênicas, antitrombóticas, antimicrobianas, vasodilatadoras e analgésicas (DEY et al., 2012). Muitos desses metabólitos secundários, em especial os compostos fenólicos, permitem a modulação do processo oxidativo no organismo, pois proporcionam um ambiente celular redutor, de forma a inibir o efeito dos radicais livres, impedindo o aparecimento de danos celulares (BRENNAN, PAGLIARINI, 2001; YILDRIM, MAVI, KARA, 2002).

### **3.5 Compostos fenólicos**

As plantas produzem uma variedade de produtos secundários que contêm um grupo fenol e um grupo hidroxila funcional em um anel aromático. Tais substâncias são classificadas como compostos fenólicos. Os fenóis vegetais constituem um grupo quimicamente heterogêneo, com, aproximadamente, 10.000 compostos, alguns solúveis apenas em solventes orgânicos; outros são ácidos carboxílicos e glicosídeos solúveis em água, e existem aqueles que são grandes polímeros insolúveis. Esses compostos podem ser agrupados em diferentes classes, de acordo com a sua estrutura química básica e em diferentes subclasses, com substituições específicas na estrutura básica, associação com carboidratos e formas polimerizadas (FARAH; DONANGELO, 2006).

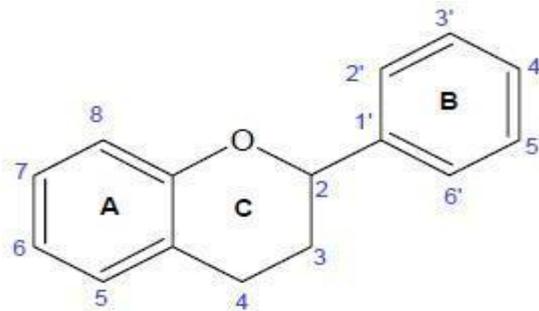
Esses compostos agem como antioxidantes, não somente pela sua habilidade em doar hidrogênio ou elétrons, mas também em virtude de seus radicais intermediários estáveis, que

impedem a oxidação de vários ingredientes do alimento, particularmente de lipídios (BRAND-WILLIAMS, 1995; NEVES et al., 2009).

### 3.6 Flavonoides

Os flavonoides são substâncias fenólicas de baixo peso molecular que estão amplamente distribuídas nas plantas superiores. Eles são varredores de radicais livres e queladores dos íons metálicos, protegendo os tecidos contra radicais livres de oxigênio e peroxidação de lipídeos (SOUZA, 2013). Quimicamente, apresentam estruturas que são compostos tricíclicos com dois anéis aromáticos (anéis A e B), sendo que o C contém o grupamento pirona, enquanto o A possui benzol. Também apresenta grupamentos de hidroxila nas posições 5 e 7, e o anel B tem cinamoil, com grupamento de hidroxilas na posição 3', 4', 5', como mostrado na Figura 5. Tem origem biossintética mista, ou seja, se compõe por subunidade derivadas de duas ou mais vias biossintéticas (MIEAN; MOHAMED, 2001).

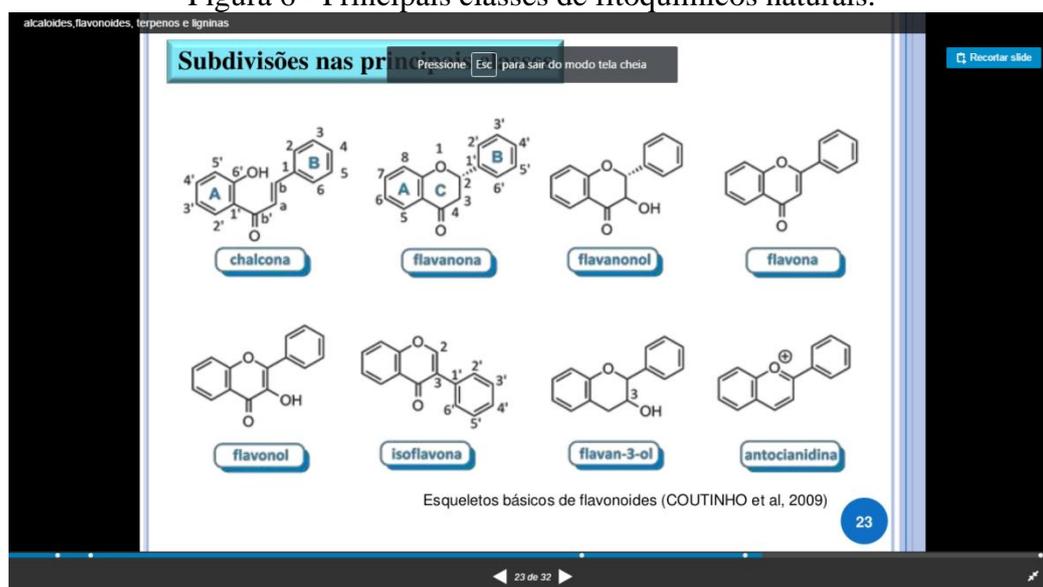
Figura 5 - Estrutura química básica de um flavonoide.



Fonte: Miean; Mohamed (2001)

A divisão dos flavonoides está baseada na conexão do anel aromático B ao anel heterocíclico e as subclasses são as seguintes: chalconas, flavanonas, flavanonóis, flavona, flavonol, antocianinas, isoflavonas, flavan-3-ol e antocianidina (Figura 6) (LIU, 2003; SOUZA, 2013).

Figura 6 - Principais classes de fitoquímicos naturais.



Fonte: Liu (2003) - Adaptado

Os flavonoides constituem a maior classe de fenólicos vegetais e são os pigmentos mais comuns depois da clorofila e carotenoides. Ocorrem, geralmente, em plantas como derivados glicosilados e seu papel fisiológico é diverso. Devido às suas cores atrativas, flavonas, flavonóis e antocianidinas contribuem como sinais visuais para os insetos durante a polinização. Além disso, a adstringência da catequina e outros flavonóis pode afastar insetos nocivos às plantas. Agem também como catalisadores da fotossíntese e reguladores dos canais de íons envolvidos na fosforilação. Também protegem células vegetais de espécies reativas de oxigênio produzidas sistema de transporte de elétrons fotossintético e, por apresentarem propriedades absorptivas de ultravioleta, protegem as plantas contra a radiação ultravioleta do sol (STALIKAS, 2007).

Os flavonoides são encontrados em frutas, flores e em alguns tipos de vegetais. Esses compostos são propensos a serem estudados, já que revelam uma relação inversamente proporcional ao uso desses metabólitos e a ocorrência de doenças degenerativas, como o câncer (KNEKT et al., 1996).

Provavelmente, as atividades realizadas pelos flavonoides são provenientes de sua ação antioxidante, por causa da sua capacidade de sequestrar oxigênio, de quelar metais e/ou doar oxigênio, sendo poderosos sequestradores de radicais livres (HUBER et al., 2007).

Os principais antioxidantes explorados no comércio são ácido ascórbico, tocoferóis e alguns extratos de plantas. Esses extratos apresentam, em sua composição, compostos fenólicos, especialmente flavonóis e ácido fenólicos, que são mais explorados pelas atividades

antioxidantes anticancerígenas e por terem ação na diminuição do risco de doenças cardiovasculares (LOULI et al., 2004; PINELO et al., 2005).

### **3.7 Atividade antioxidante e antimicrobiana dos extratos de plantas medicinais: *Pereskia* sp.**

Antioxidante é qualquer substância que, quando presente em baixa concentração, comparada à do substrato oxidável, diminui ou inibe significativamente a oxidação do meio (HALLIWELL, 2000). Os antioxidantes são classificados em dois grupos, os primários e os secundários. Os antioxidantes primários são capazes de interromper a cadeia de radicais, cedendo hidrogênio aumenta radical lipídico livre e assumindo a forma de radical estável. Os secundários reduzem o processo de iniciação, utilizando agentes quelantes de metais (GORDON, 1990).

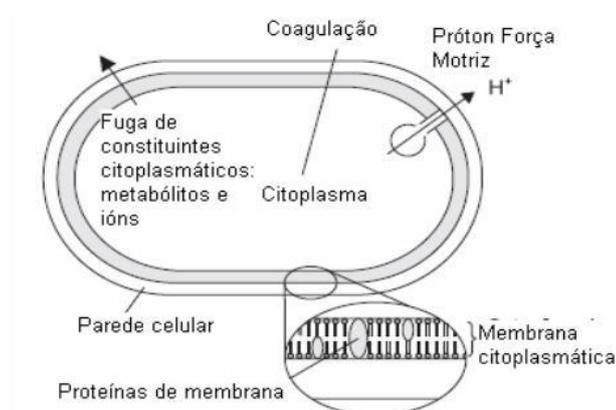
Os antioxidantes naturais podem ser extraídos de vegetais e plantas disponíveis, sendo excelentes fontes de terpenos, compostos fenólicos e nitrogenados. Tais substâncias têm demonstrado alto potencial de compostos bioativos, podendo ser utilizadas, principalmente, na indústria alimentícia e na farmacêutica (ZHENG; WANG, 2001).

Os antioxidantes obtidos diariamente na dieta, tais como vitaminas A, C e E, flavonoides e carotenóides, promovem ação protetora contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo, sendo extremamente importantes na interceptação dos radicais livres. O uso das plantas medicinais é amplamente estudado, devido às propriedades antioxidantes e antimicrobianas, tanto de seus óleos essenciais quanto de seus extratos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006).

Os microrganismos patogênicos estão se mostrando resistentes à maioria dos antimicrobianos conhecidos, o que incentiva ainda mais a procura por antibióticos de ocorrência natural (SOUZA, 2013; LOPES et al., 2005).

Os locais, ou estruturas, da célula bacteriana que são considerados sítios de ação para os componentes de produtos naturais estão ilustrados na Figura 10. Geralmente, os mecanismos de ação de compostos naturais são caracterizados pela desintegração da membrana citoplasmática, a desestabilização da força próton motriz (FPM), o fluxo de elétrons, o transporte ativo e a coagulação do conteúdo da célula. Nem todos os mecanismos de ação agem em alvos específicos, podendo alguns sítios ser afetados por outros mecanismos (BURT, 2004).

Figura 10 - Locais e mecanismos de ação que podem ser sítios para ação de compostos naturais na célula bacteriana.



Fonte: Burt (2004) - Adaptado

Em virtude da grande diversidade química existente, particularmente entre os compostos fenólicos, vários ensaios *in vitro* têm sido desenvolvidos para avaliar a capacidade antioxidante de diferentes amostras. Entre esses diversos métodos e sistemas de solventes para a extração de compostos antioxidantes em vegetais existem alguns fatores que podem afetar o processo, como tipo do solvente e polaridade podem afetar a transferência de elétrons e de átomos de hidrogênio. Sendo relevante a capacidade antioxidante; a presença de compostos não antioxidantes nas soluções testadas (PEREZ-JIMENEZ; SAURA-CALIXTO, 2006).

Dessa forma, existem diversos métodos para a extração dos compostos antioxidantes em vegetais, dentre os quais podem ser citados os métodos tradicionais de extração utilizando solventes (como água, etanol, éter, acetato de etila, clorofórmio, hexano e metanol) e a extração supercrítica que, mediante as mudanças na pressão e na temperatura, transforma o dióxido de carbono (CO<sub>2</sub>) em fluido supercrítico para a extração (LEAL et al., 2003; REHMAN; HABIB; SHAH, 2004). Apesar da utilização de diferentes solventes no processo de extração e métodos para a determinação da atividade antioxidante, ainda não existe um procedimento metodológico universal (FRANKEL; MEYER, 2000).

Turra et al. (2007), ao avaliarem os extratos brutos das folhas de *P. grandifolia* nas concentrações de 100 e 1.000 µg L<sup>-1</sup>, na presença de DPPH, observaram que, na concentração de 1.000 µg mL<sup>-1</sup>, a capacidade de neutralização dos radicais livres de DPPH variou de 10% a 31,5%, enquanto, na concentração de 100 µg mL<sup>-1</sup>, a capacidade de inibição variou de 3,5% a 5,8%. Tais autores relataram que a planta não atuaria como eficaz agente antioxidante.

No que tange a atividades microbiológicas, nenhum dos extratos avaliados apresentou atividade antimicrobiana para cepas de *Staphylococcus aureus*, *Esherichia coli*, *Bacillus*

*subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Candida albicans*. Zareis e dehizadehet et al. (2014) pesquisaram as propriedades antibacteriana, antiviral e antifúngica *in vitro* de *Pereskia bleo*. Os extratos metanólico e hexânico demonstraram eficiente atividade antibacteriana contra *Salmonella* sp. e *Pseudomonas aeruginosa*. Além disso, o extrato de *Pereskia bleo* obtido com solvente diclorometano mostrou efeito antibacteriano promissor contra *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina.

Philip et al. (2009) observaram que nenhum dos extratos de *P. grandifolia*, nas concentrações de 50 e 500 mg mL<sup>-1</sup>, demonstrou atividade contra *Escherichia coli*. Somente o extrato etila acetato, na concentração de 500 mg mL<sup>-1</sup>, mostrou atividade antimicrobiana contra *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus subtilis*.

Dentre os estudos encontrados na literatura, são poucos aqueles nos quais foram relatadas as atividades biológicas antioxidantes e antimicrobianas de extratos de *Pereskia grandifolia* Haw. (Sim 2010; Turra et al. 2007). Assim, existe a necessidade de estudá-los, principalmente contra microrganismos causadores de infecções, tais como *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*.

### **3.8 *Pseudomonas aeruginosa***

*Pseudomonas aeruginosa*, pertencente ao gênero *Pseudomonas*, são bacilos gram-negativos, aeróbios e móveis. Possuem necessidades nutricionais mínimas, sobrevivendo em uma grande variedade de ambientes. Encontram-se amplamente distribuídas no solo e na água, e podem também fazer parte da microbiota normal do trato intestinal e da pele de 3% a 5% da população. É patógeno oportunista associado a infecções hospitalares, urinárias e sepsis, estando mais suscetíveis pacientes com queimaduras, cateterismo urinário, fibrose cística, diabetes e neutropenia (MARRA et al., 2006; THOMPSON; BONOMO, 2005).

*P. aeruginosa* é um patógeno comum em infecções sistêmicas, com alta mortalidade, a qual pode chegar a 33% em pacientes imunocomprometidos (MARRA et al., 2006). A variedade de sítios de infecção e a aquisição de mecanismos de resistência revelam grande capacidade de adaptação ao meio. Apresenta vários fatores de virulência, dentre eles polissacarídeos, flagelos epilitipo IV, importantes para a adesão e a colonização dos tecidos. Outros fatores de virulência são as piocianinas, que impedem a proliferação da epiderme e de linfócitos; lipídeos, que solubilizam o surfactante pulmonar e elastases, que reduzem a elasticidade pulmonar, facilitando a colonização do tecido (BERRE et al., 2006).

### 3.9 *Staphylococcus aureus*

*Staphylococcus* são cocos gram-positivos, imóveis, com diâmetro entre 0,5 a 1,5  $\mu\text{m}$  e, por dividirem-se em planos diferentes quando vistos ao microscópio, aparecem na forma de cacho de uvas. São bactérias anaeróbias facultativas, com maior crescimento sob condições aeróbias, e produzem catalase (FRANCO; LANDGRAF, 2008; GARRITY, 2006).

Os *Staphylococcus aureus* são microrganismos comumente encontrados na pele e na cavidade nasal da população (RAZERA *et al.*, 2009, MOURA *et al.*, 2010; SANTOS, 2007). Essa colonização determina o estado de portador ou portador assintomático, uma vez que a presença da bactéria no organismo do hospedeiro não ocasiona lesões aparentes (CAVALCANTI *et al.*, 2006)

As infecções causadas por essa bactéria frequentemente acometem a pele e os tecidos subcutâneos, sendo muito comum sua associação com dispositivos e aparelhos implantados, especialmente em pacientes cujo sistema imunológico encontra-se debilitado, bem como em crianças e idosos (CAVALCANTI *et al.*, 2006). Algumas dessas infecções têm caráter agudo e podem gerar focos metastáticos, disseminando para outros tecidos. Há, ainda, o risco de infecções mais graves, como bacteremia, pneumonia, osteomielite, endocardite, miocardite, pericardite, meningite, abscessos musculares e cerebrais (GELATTI *et al.*, 2009). É válido lembrar que estes últimos são episódios frequentemente associados com alta morbidade e mortalidade (JONES, 2003; CASTELLANO GONZALEZ *et al.*, 2005).

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1 Coleta e identificação do material botânico**

Plantas de *Pereskia grandifolia* Haw. foram coletadas no Horto de Plantas Medicinais da Universidade Federal de Lavras (21°14'07" S; 44°58'22" O; 879 m de altitude). As folhas foram identificadas no Departamento de Biologia da mesma universidade e a exsicata (Registro) depositada no Herbário da EPAMIG-BH.

### **4.2 Determinação da umidade**

Para a determinação da umidade utilizaram-se 100 g de folhas frescas. A amostra foi desidratada em estufa, a 105°C, por 48 horas, colocada em dessecador por 30 minutos e a pesagem efetuada até peso constante. A análise foi realizada em duplicata. O resultado foi expresso em percentagem.

### **4.3 Preparo dos extratos**

Os extratos (5% p/v) foram preparados por refluxo e sonicação a partir de folhas frescas de *P. grandifolia*. As folhas foram rasuradas em tamanho de 0,5 cm<sup>2</sup>. Para ambos os extratos utilizou-se água ou solução etanólica a 70%, como solvente extrator.

Para o preparo dos extratos aquosos e etanólicos por refluxo, os materiais vegetais foram individualmente destilados, por 30 minutos, em fervura em sistema fechado, para reduzir as possíveis perdas por volatilização.

Os extratos obtidos por sonicação foram preparados em banho de ultrassom Nova, modelo NI1204, 50Hz, empregando-se um ciclo ininterrupto de 30 minutos.

Os extratos foram filtrados por filtração simples e os rendimentos extrativos foram calculados.

### **4.4 Determinação do rendimento extrativo**

Os rendimentos extrativos foram determinados por gravimetria, a partir da secagem em estufa, a 105°C, de 10 mL de cada extrato em cadinhos de porcelana, até peso constante (Farmacopéia Brasileira, 2010). As análises foram realizadas em duplicata.

#### 4.5 Determinação do pH

Para a determinação do pH, as amostras foram dissolvidas a 5% (m/v) em água destilada. As análises foram realizadas em pH metro digital (GEHAKA, PG 2000) previamente calibrado com soluções tampão pH 4,0 e 6,86 (Farmacopéia Brasileira, 2010). O resultado corresponde à média de três determinações (MUNHOZ *et al.*, 2012).

#### 4.6 Avaliação da atividade antioxidante dos extratos de *P. grandifolia* Haw.

##### 4.6.1 Reagentes e equipamentos

Foram utilizados os seguintes reagentes: solução de Folin-Ciocalteu; carbonato de sódio ( $\text{Na}_2\text{CO}_3$ ); cloreto de alumínio ( $\text{AlCl}_3$ ); ácido gálico; ácido tiobarbitúrico (TBA); 2,2-difenil-1-picril-hidrazil (DPPH); ácido 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-sulfônico (ABTS); ferricianeto de potássio [ $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ ]; deoxiribose; 2,4-dinitrofenol (DNP); hidróxido de potássio (KOH); ácido tricloroacético (TCA); ferrozina [3-(2-piridil)-5,5-bis-(4-ácido fenil sulfônico)-1,2,4-triazina]; ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA), persulfato de potássio ( $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$ ); cloreto tetra-hidratado de ferro II ( $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ); sulfato hepta-hidratado de ferro II ( $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ), Espanha); peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ); sulfato de dodecil sódio (SDS). L(+)-ácido ascórbico (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha) pureza 99,7%-100,5%; naringenina (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha) pureza  $\geq 95\%$ ; ácido gálico anidro (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha) pureza  $\geq 98\%$  equerretina (Sigma-Aldrich®, Steinheim, Alemanha) pureza  $\geq 95$ .

Os equipamentos incluíram leitora de microplacas TECAN Infinity® M200 PRO, operado pelo *software* I-control® versão 3.37; balança de IV OHAUS modelo MB45 eturboextrator Turratec modelo MA 102.

##### 4.6.2 Determinação dos fenóis totais

A quantificação dos compostos fenólicos totais (FT) foi determinada pelo método colorimétrico, empregando-se o reagente Folin-Ciocalteu descrito por Slinkard e Singleton (1977). A curva de calibração foi preparada com ácido gálico.

As reações foram realizadas em tubos de vidro. Utilizaram-se 20  $\mu\text{L}$  dos extratos, 125 mL de  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  e 100 mL de solução etanólica de Folin-Ciocalteu a 10% (v/v). Em seguida, foram transferidos 250  $\mu\text{L}$  para a microplaca de 96 poços, reagindo por 120 minutos no

escuro, à temperatura ambiente, realizando-se a leitura em espectrofotômetro a 760nm na sequência. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em miligrama equivalentes em ácido gálico por g de peso seco da amostra (mg EAG/g).

#### **4.6.3 Quantificação flavonoides (flavonas e flavonoides totais)**

O conteúdo de flavonoides totais nos extratos foi determinado pelo método de AHN et al. (2004). Resumidamente, 100 µL de solução aquosa de cloreto de alumínio (AlCl<sub>3</sub>) a 2% foram misturados com o mesmo volume da solução de amostra (100 µL de cada extrato). Após 60 minutos à temperatura ambiente, as absorvâncias das amostras foram mensuradas a 420nm, contra um branco [100 µL de solvente (água ou etanol 70%) + 100 µL solução de AlCl<sub>3</sub>]. O conteúdo total de flavonoides foi determinado utilizando-se uma curva padrão de quercetina com cinco pontos de concentrações (0,125, 0,0625, 0,0312, 0,0156 e 0,0078 µg/mL).  $y = 16,944x - 0,0351$ , em que y é a absorvância e x é a concentração;  $R^2 = 0,9999$ . O conteúdo total de flavonoides totais foi expresso em miligramas equivalentes de quercetina por grama de extrato seco (mg EQ/g).

#### **4.6.4 Quantificação de flavonas e di-hidroflavonóis totais**

A quantificação de flavonas e di-hidroflavonóis totais foi realizada de acordo com Popova, Bankova e Butovska (2004). Foram misturadas 500µL de solução metanólica de 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP) com 200µL da solução de amostra ou padrão e aquecidas, a 50°C, por 50 minutos. Após arrefecimento à temperatura ambiente, foram adicionados 2mL de KOH 10% em metanol (v/v) à solução reagente (amostra+DNP). Em seguida, 50µL da solução reagente (amostra+DNP+KOH) foram diluídos em 500µL de metanol e centrifugados, a 3.000rpm, por 10 minutos. Um volume de 250µL de cada amostra foi transferido para os poços da microplaca. As absorvâncias foram lidas a 486nm, contra um branco [200µL de solvente (água/ etanol 70%)+ 500µL de DNP + 2.000µL de KOH 1%]. O conteúdo total de di-hidroflavonoides foi determinado utilizando-se uma curva padrão de naringenina com seis pontos de concentrações (3; 1,5; 0,75; 0,375; 0,1875 e 0,0937 µg/mL).  $Y = 0,7118x - 0,0611$ , em que y é a absorvância e x é a concentração;  $R^2 = 0,9999$ . Os resultados foram expressos em miligrama equivalentes em naringenina por g de extrato seco (mg EN/g).

#### 4.6.5 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total foi mensurada com base no método de redução do molibdato de amônio descrito por Prieto, Pineda e Aguilar (1999). Para isto, 100µL dos extratos foram misturados com 3mL da solução reagente (ácido sulfúrico 0,6M, fosfato de sódio, 28mM e molibdato de amônio 4mM). Após reação por 90 minutos, a 95°C, as amostras foram arrefecidas à temperatura ambiente e suas absorvâncias mensuradas a 695nm. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados expressos em miligrama equivalentes em ácido ascórbico por g de peso seco da amostra (mg EAG/g).

#### 4.6.6 Determinação do poder quelante

O grau de quelação dos íons de ferro II pelos extratos foi avaliado de acordo com Miguel et al. (2014). Em alíquotas de 100µL dos extratos adicionaram-se 30µL de  $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  (2mM). Em seguida, acrescentaram-se 40 µL de ferrozina (5 mM) e as soluções reativas foram incubadas por 10 minutos, a 25°C. A absorvância das soluções foi medida a 562nm. A porcentagem de inibição da formação do complexo ferrozina- $\text{Fe}^{2+}$  foi determinada por meio do empregada fórmula  $[(A_0 - A_1)/A_0 * 100]$ , em que  $A_0$  é a absorvância do complexo ferrozina- $\text{Fe}^{2+}$  e  $A_1$  a absorvância das amostras analisadas. Os resultados foram expressos como  $\text{IC}_{50}$ , correspondendo à concentração eficaz para a quelação de 50% de íons ferro de II. EDTA foram utilizados como controle positivo e as amostras foram analisadas em triplicatas.

#### 4.6.7 Atividade de eliminação de radicais livres (DPPH)

A atividade da captura de radicais livres por DPPH foi realizada conforme o método proposto por Brand-Williams, Cuvelier e Berset (1995). Diferentes concentrações das amostras (3,12-0,19 mg/mL) foram adicionadas a 270 µL de solução metanólica de DPPH 0,2 mM. As soluções foram incubadas à temperatura ambiente, no escuro, por 60 minutos e as leituras espectrofotométricas realizadas a 517 nm. BHT foi utilizado como controle positivo e o metanol, como controle negativo. A atividade da captura de radicais livres por DPPH foi expressa pela porcentagem de inibição (50%), calculada pela fórmula  $\text{IC}_{50}(\%) = (A_0 - A_1) / A_0$ , em que  $A_0$  é a absorvância do controle negativo e  $A_1$  a absorvância das amostras. A atividade de eliminação de radicais livres foi expressa como  $\text{IC}_{50}$ , correspondendo à concentração de extrato capaz de inibir 50% dos radicais DPPH.

#### 4.6.8 Determinação do poder redutor

Utilizou-se o método de Oyaizu (1986) para a determinação do poder redutor dos extratos. Volumes de 50µL da amostra foram misturados homogeneamente com 500µL de tampão fosfato de sódio 0,2M (pH 6,6) e 500µL de solução aquosa de ferricianeto de potássio a 1% (p/v). A mistura foi incubada, a 50°C, por 20 minutos. Em seguida, 500µL de solução aquosa de ácido tricloroacético a 10% (p/v) foram adicionados à mistura e centrifugados, a 5.000 rpm, por 10 minutos. O sobrenadante (0,5mL) foi misturado a 0,5mL de água destilada e 100µL de solução aquosa de cloreto férrico a 0,1% (p/v). A intensidade da cor azul-verde foi medida a 700nm. O poder redutor foi expresso pelo valor da absorbância, a 700nm. O ácido ascórbico foi utilizado como controle positivo e os ensaios com o extrato realizado em triplicata.

#### 4.7 Perfil cromatográfico dos extratos

Para análise dos perfis cromatográficos exploratórios dos extratos brutos de *Pereskia grandifolia* Haw. foi utilizado cromatógrafo Agilent Série 1200, com pré-coluna Zorbax ODS 4-Pack (4,6 d.i. × 12,5 mm × 5 µm) e coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (4,6 d.i. × 150 mm × 5 µm). As análises foram realizadas a 40 °C, com fluxo de 1 mL/min e detecção no comprimento de onda de 210 nm. Espectros no UV, na faixa de 205 a 400 nm, foram registrados on-line para cada pico. Foi utilizado sistema de eluição em gradiente linear, com fase móvel composta por água (A) e acetonitrila (B), conforme descrito na Tabela 1, sendo a fase móvel composta por água e acetonitrila acidificadas com 0,1% de ácido fosfórico.

Tabela 1 - Gradiente de eluição empregado para registro dos perfis cromatográficos exploratórios por CLAE-FR.

<b>Tempo (min)</b>	<b>A (%)</b>	<b>B (%)</b>
0	95	5
65	5	95
70	5	95

Le

A = água e B = acetonitrila. Ambos os eluentes foram acidificados com 0,1% de ácido fosfórico.

## **4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana dos extratos de *Pereskia grandifolia***

As análises microbiológicas dos extratos foram realizadas no Laboratório de Microbiologia de Alimentos, no Departamento de Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Lavras (UFLA), em Lavras, MG.

### **4.8.1 Microrganismos e obtenção do inóculo**

As cepas utilizadas no experimento foram *Staphylococcus aureus* GL 4133 e *Staphylococcus aureus* GL 5674, cedidas pela Embrapa Gado de Leite sediada em Juiz de Fora, MG, e *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 25853, cedida pela Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz). As culturas estoque foram armazenadas em meio de congelamento (glicerol: 15 mL; peptona bacteriológica: 0,5 g; extrato de levedura: 0,3 g; NaCl: 0,5 g; água destilada: 100 mL) e congeladas durante o período de execução do experimento.

A reativação das cepas foi realizada inoculando-se 100 µL da cultura em tubos contendo 10 mL de caldo BHI (*Brain Heart Infusion Broth*), com incubação a 37°C/24h, em condições aeróbicas para a padronização do inóculo em 10<sup>8</sup> UFC/g, por meio da escala de McFarland.

### **4.8.2 Sensibilidade a antibióticos**

O teste de sensibilidade aos antimicrobianos foi realizado utilizando-se o método de disco-difusão em ágar, segundo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005).

Os microrganismos foram reativados em caldo BHI, a 37°C, por 24 horas e o inóculo padronizado com densidade celular correspondente a 10<sup>8</sup> UFC/mL, por Escala de McFarland.

Foi realizado espalhamento em superfície em ágar TSA e, posteriormente, foram adicionados os discos contendo os seguintes antibióticos, para as estirpes gram-positivas e gram-negativas: cefalotina (30mg), gentamicina (10mg) e enrofloxacina (5mg).

As placas foram, então, incubadas, a 37°C, por 24 horas e, após esse período, procedeu-se à mensuração dos halos de inibição ao redor dos discos.

#### 4.8.3 Atividade antimicrobiana dos extratos de *P. grandifolia*

A atividade antimicrobiana dos extratos de *P. grandifolia* foi realizada utilizando-se método de difusão em ágar seguindo recomendações do *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2005).

Os microrganismos foram reativados em caldo BHI, a 37°C, por 24 horas e o inóculo padronizado com densidade celular correspondente a 10<sup>8</sup> UFC/mL, por Escala de McFarland.

Foi realizado espalhamento em superfície em ágar TSA e, posteriormente, foram adicionados os discos contendo os seguintes extratos (5% p/v) a partir de folhas frescas de *P. grandifolia*: hidrolato, aquoso (sonicação), aquoso (refluxo), aquoso (maceração) e etanólico 70% (maceração). Como controle positivo foi utilizada gentamicina (10 mg).

As placas foram, então, incubadas, a 37°C, por 24 horas e, após esse período, procedeu-se à mensuração dos halos de inibição ao redor dos discos. A metodologia foi feita em triplicata e três repetições.

#### 4.8.4 Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos extratos

A concentração mínima bactericida (CMB) dos extratos foi determinada empregando-se a técnica de microdiluição em caldo, em placas de poliestireno de 96 cavidades, de acordo com o NCCLS (M7-A6) (NCCLS,2003), com adaptações.

Os diferentes extratos foram diluídos obtendo-se concentrações de 0,0781;0, 1562; 0,3125; 0,625; 1,25 e 2,5 (v/v).Alíquotas de 150 µL das soluções de extratos foram adicionadas nas cavidades contendo 150 µL TSB, e assim sucessivamente, até obter as concentrações propostas e inocularam-se 10 µL das culturas padronizadas a 10<sup>8</sup> UFC/mL. Como controle negativo foi utilizado álcool 70%. As microplacas foram vedadas e incubadas, a 37°C/24horas. Após esse período foi realizada leitura da absorbância em leitora de Elisa da Tecan (D0 600 nm). O experimento foi realizado em triplicata e três repetições no tempo.

#### 4.9 Análise estatística

A análise estatística dos dados foi realizada no programa SISVAR, versão 5.3 (FERREIRA, 2010). As médias entre os tratamentos foram submetidas à análise de variância (ANOVA), pelo teste F, e comparadas pelo teste Scott-Knott, ap < 0,05.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Cálculo de umidade

A umidade de um alimento está relacionada com sua estabilidade, qualidade e composição. A umidade da *Pereskia grandifolia* a partir de folhas coletadas no Horto de Plantas Medicinais da UFLA foi de 76%.

### 5.2 Rendimento extrativo

Como pode ser observado na Tabela 2, para o rendimento extrativo foram observados valores diferentes, variando bastante de acordo com os métodos de extração, tendo o extrato de refluxo etanólico sido o que apresentou melhor rendimento.

Tabela 2 - Rendimento dos diferentes extratos obtidos da *P. grandifolia*.

<b>Extratos</b>	<b>Rendimento (%)</b>
Refluxo aquoso	0,28
Sonicação aquoso	*
Refluxo hidroetanólica	0,95
Sonicação hidroetanólica	0,83

\*Não determinado (amostra insuficiente para o ensaio).

### 5.3 Determinação do pH

Na análise dos valores de pH não se verificou diferença marcante entre os extratos aquosos e os extratos etanólicos, obtendo-se valores entre 5,6-6,5. De acordo com Ferreira e Áquila (2000), valores extremos de pH podem mascarar o efeito fitoterápico dos extratos. Na Tabela 3 são apresentados os valores de pH para os diferentes extratos.

Tabela 3 - Valores de pH dos diferentes extratos obtidos da *P. grandifolia*.

<b>Extratos</b>	<b>pH</b>
Refluxo aquoso	5,62
Sonicação aquoso	6,02
Refluxo hidroetanólica	6,44
Sonicação hidroetanólica	6,48

### 5.5 Quantificação de compostos fenólicos e atividades antioxidantes dos extratos

Os resultados obtidos nas quantificações de compostos fenólicos dos extratos de *P. grandifolia* estão apresentados na Tabela 4.

Tabela 4 - Teores de constituintes fenólicos totais de diferentes extratos de *P. grandifolia*.

Extratos	Fenólicos totais	Flavonas e flavonóis totais	Flavanonas e di-hidroflavonóis totais
Refluxo aquoso	8,66±0,64a	0,42±0,01b	1,29±0,01 <sup>a</sup>
Sonicação aquoso	1,31±0,11	0,08±0,00d	0,55±0,07c
Refluxo hidroetanólico	6,11±0,25b	0,49±0,04a	1,26±0,01b
Sonicação hidroetanólica	4,76±0,22c	0,22±0,00c	1,31±0,07 <sup>a</sup>

Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si, a  $P < 0,05$ , segundo o teste de Scott-Knott. Fenólicos totais: expressos em mg equivalentes de ácido gálico/g de folha fresca (mg EAG/g). **Flavonoides**: expressos em mg equivalentes de quercetina/g de folha fresca (mg EQ/g). **Di-hidroflavonoides**: expressos em mg equivalentes de naringenina/g de folha fresca (mg EN/g).

A demanda crescente para extrair compostos bioativos de plantas estimula a busca contínua por métodos de extração convenientes. A extração líquido-sólido pode ser definida como um fenômeno de transporte de massa em que os sólidos contidos nas estruturas das plantas migram para o solvente até o equilíbrio (Uribe et al. 2015). A extração é o primeiro passo de qualquer estudo de plantas medicinais, o qual desempenha papel significativo e crucial sobre o resultado final. A fim de encontrar métodos de extração efetivos que contribuam nas análises químico-biológicas de compostos naturais, diferentes métodos de extração têm sido propostos (Azmir et al. 2013; Azwanida 2015).

### 5.6 Fenólicos totais

Os compostos fenólicos são constituintes comuns da dieta humana e são encontrados principalmente em frutas e vegetais. Seu consumo tem sido sugerido proporcionar benefícios à saúde, devido às suas propriedades antioxidantes (Spencer, et al., 2008).

O teor de fenol total foi determinado por uma modificação do método de Folin-Ciocalteu, descrito por Singleton, Orthofere Lamuela-Raventós (1999). A quantidade de fenóis totais nos extratos examinados variou de 1,31±0,11 a 8,66±0,64 mg EAG/g planta seca. A recuperação de compostos fenólicos, expressa como equivalentes de ácido gálico, foi afetada pelo método de extração. O método de extração de refluxo apresentou a maior

quantidade de fenólicos totais usando água como solvente de extração ( $8,66 \pm 0,64$  mg EAG /g), seguido de etanol 70% ( $6,11 \pm 0,25$  mg EAG /g), enquanto a sonicação aquosa apresentou a menor quantidade fenólica total ( $1,31 \pm 0,11$  mg EAG /g).

O extrato obtido por maceração metanólica de folhas secas de *P. grandifolia* apresentou quantidade similar de compostos fenólicos totais à do presente estudo, quando comparado ao refluxo aquoso ( $10,30$  mg/g de folha seca apresentada como  $38,54 \pm 0,48$  mg of GAEs/g do extrato) (Sim et al. 2010).

O método de extração por refluxo revelou-se um método eficaz para a extração de compostos fenólicos em *P. grandifolia*. Os dados também mostram que as concentrações de compostos fenólicos totais foram afetadas significativamente ( $p < 0,05$ ) pelo solvente extrator e pela temperatura. Resultados similares foram relatados por Ereifej et al. (2016).

### 5.7 Flavonas e flavonóis totais

Os flavonoides são um grupo de compostos naturais encontrados em plantas, com estruturas fenólicas variáveis. Eles podem ser divididos em uma variedade de classes, tais como flavonas, flavonóis, flavanones e outros (KUMAR, PANDEY 2013).

Os resultados indicaram que a maior recuperação de flavonas e flavonóis totais foi obtida por refluxo hidroetanólico ( $0,49 \pm 0,04$  mg QE/g folha seca), seguido pelo refluxo aquoso ( $0,42 \pm 0,01$  mgQE/g folha seca).

Independente do solvente extrator, o método de refluxo foi mais efetivo que a sonicação na extração de fenólicos e flavonas/flavonóis totais, demonstrando que a temperatura é um fator significativo na recuperação desses constituintes em *P. grandifolia*. O aquecimento pode amaciar o tecido da planta e enfraquecer as interações fenol e fenol-proteína de polissacarídeos; por conseguinte, mais polifenóis migrariam para o solvente (Shi et al. 2003) Além disso, conforme CARVALHO et. al. (2009), extratos de *Pereskia* são estáveis sob temperaturas elevadas.

### 5.8 Flavanonas e di-hidroflavonóis totais

O método de quantificação de flavanonas/di-hidroflavonóis totais baseia-se na interação destes compostos com 2,4-dinitrofenil-hidrazina (DNP) em meio ácido (ácido sulfúrico) para formar fenil-hidrazonas coloridas. A absorvância é medida a 486 nm. O princípio deste método é que o reagente 2,4-dinitrofenil-hidrazina reage com carbonilas cetônicas e aldeídicas para formar 2,4-dinitrofenil-hidrazona, resultando numa cor vermelha (PONTIS et al. 2014).

Os resultados revelaram que as concentrações de flavanonas/di-hidroflavonóis totais variaram de acordo com o solvente e o método utilizado para extração. A quantidade variou de  $0,55\pm 0,07$  a  $1,31\pm 0,07$  mg NE/g folha seca.

Na recuperação de flavanonas e di-hidroflavonóis em *P. grandifolia*, a variável solvente extrator demonstrou ser essencial na eficiência extrativa ( $P < 0,05$ ). O extrato hidroetanólico obtido por sonicação exibiu o maior teor de flavonona e di-hidroflavonol, enquanto a sonicação com água recuperou mínimas quantidades desses flavonoides. O mesmo comportamento foi observado para o refluxo.

Os solventes polares são frequentemente utilizados para a extração de polifenóis de materiais vegetais. Os solventes mais empregados são misturas aquosas contendo etanol, metanol, acetona e acetato de etila. O etanol é reconhecido como um bom solvente para a extração de polifenóis, devido à sua segurança para o consumo humano (DAI, MANPER, 2010).

## 5.9 Atividade antioxidante

Tabela 5 - Atividade antioxidante dos extratos de *P. grandifolia* Haw. flavonóid sob diferentes métodos.

Extrato	DPPH <sup>2</sup>	CAT <sup>1</sup>	Poder Quelante <sup>2</sup>
Refluxo aquoso	$0,21\pm 0,01c$	$2,31\pm 0,04b$	$0,55\pm 0,05b$
Sonicação aquoso	$2,85\pm 0,02a$	$0,34\pm 0,07c$	$1,66\pm 0,04^a$
Refluxo hidroetanólico	$0,43\pm 0,01c$	$1,8\pm 0,27a$	$0,87\pm 0,04b$
Sonicação hidroetanólico	$0,93\pm 0,04b$	$0,57\pm 0,03c$	$2,19\pm 0,06^a$

Médias seguidas de mesmas letras na coluna não diferem estatisticamente entre si, a  $P < 0,05$ , segundo o teste de Scott-Knott.<sup>1</sup> CAT: Capacidade antioxidante total em mg equivalente do ácido ascórbico.<sup>2</sup> IC<sub>50</sub> mg/ml.

Existem vários métodos para avaliar a atividade antioxidante, como o método de formação do complexo fosfomolibdênio ou a atividade antioxidante em relação à redução de um radical, como o DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazila) (BRAND-WILLIAMS., 1995; HUANG., 2005; VICENTINO, MENEZES, 2007; RODRÍGUEZ I L., 2008; FONSECA., 2009; MOSQUERA., 2009; REBELO., 2009).

Neves (2009) afirma que a propriedade de doador de elétrons que os compostos antioxidantes apresentam permite a modulação do processo oxidativo no organismo, pois proporciona um ambiente celular redutor, de forma a inibir o efeito dos radicais livres, impedindo o aparecimento de danos celulares.

### 5.10 Capacidade antioxidante total

A capacidade antioxidante total se baseia na capacidade de o composto gerar a redução do molibdato de amônio. Observa-se, na Tabela 5, que tanto o refluxo quanto a sonicação hidroetanólica apresentaram maior poder redutor do molibdato ( $p < 0,05$ ). Assim sendo, apresenta maior capacidade antioxidante.

Extratos obtidos pelo método de refluxo apresentaram melhores atividades antioxidantes, quando comparados com extratos obtidos por sonicação, método pelo qual não se emprega aquecimento. Como já discutido anteriormente, os extratos obtidos por refluxo apresentaram maiores quantidades de compostos fenólicos e isto poderia explicar as melhores atividades observadas.

### 5.11 Atividade captadora de radical livre de DPPH

Neste estudo, o resultado foi expresso em  $IC_{50}$ , que é a concentração necessária do antioxidante para reduzir em 50% o radical livre DPPH, sendo que quanto menor o  $IC_{50}$ , maior a atividade antioxidante do material (CHOI., 2002). Diante disso, na Tabela 5, observa-se que a melhor atividade antioxidante ocorreu nos extratos obtidos por refluxo aquoso e etanólico, em que houve aquecimento.

Os resultados de  $IC_{50}$  variaram de  $0,21 \pm 0,01$  a  $2,85 \pm 0,02$  mg/mL, sendo a maior atividade sequestradora do radical livre DPPH para o refluxo aquoso. Este mesmo extrato obteve maior concentração de fenóis totais.

A atividade antioxidante pode vir dos compostos fenólicos que podem participar juntos com os flavonoides na determinação dessas atividades antioxidantes (CASTRO., 2007; SILVA., 2006).

### 5.12 Poder quelante

As espécies reativas de oxigênio são formadas como intermediários necessários de reações de oxidação catalisadas por metais. O íon de metal de transição  $Fe^{2+}$  tem a capacidade para perpetuar a formação de radicais livres por perda ou ganho de elétrons. Portanto, a redução da formação de espécies de oxigênio reativas pode ser conseguida pela quelação de íons metálicos com agentes quelantes (Sudan et al. 2014). A atividade antioxidante de compostos pode ser de dois tipos: primária, quando se liga a radicais livres ou secundária,

quando tem capacidade quelante de metais de transição. O sinergismo aparece quando ocorrem os dois mecanismos (FENNEMA, 2000).

Na avaliação da atividade quelante, a ferrozina, um reagente cromogênico, torna a solução rósea de acordo com a quantidade de ferro disponível em solução, complexando íons metálicos. Assim, quanto menor a quelação de íons pela amostra, maior o número de íons disponíveis para reação com a ferrozina e maior será a absorvância (MIGUEL 11., 2010).

As  $IC_{50}$  observadas para o poder quelante variaram de  $0,55 \pm 0,05$  a  $2,19 \pm 0,06$  mg/mL. Os extratos obtidos por refluxo, independente do solvente aquoso ou hidroalcoólico, indicaram maiores atividades, os quais são iguais estatisticamente entre si e diferentes em relação aos extratos obtidos por sonicação ( $p < 0,005$ ).

### 5.13 Poder redutor

A capacidade dos extratos de reduzir os íons de  $Fe^{3+}$  a  $Fe^{2+}$  foi avaliada em comparação ao ácido ascórbico, segundo a metodologia de OYAIZU(1986).

Nem todos os elementos têm a mesma capacidade de doar ou receber elétrons, isto é, os elementos não têm o mesmo poder oxidante ou redutor. Dessa forma, alguns compostos apresentam maior capacidade para atuar como oxidantes, enquanto outros como redutores. A maioria dos metais apresenta maior poder redutor, pois eles perdem facilmente elétrons. A capacidade de reduzir íons de ferro é geralmente associada com a presença de agentes redutores (DORMAN., 2003; PIN-DER-DUH, 1998), os quais exercem ação antioxidante, quebrando a cadeia de radicais livres doando um átomo de hidrogênio (GORDON, 1990).

Segundo GÓMEZ-PLAZA, MIÑANO, LÓPEZ-ROCA (2006), água e solventes hidroalcoólicos são preferidos quando o objetivo é obter corantes ou produtos antioxidantes para a indústria de alimentos, devido à baixa toxicidade e abundância.

Todos os extratos apresentaram capacidade de reduzir  $Fe^{3+}$ . Esta capacidade foi dose-dependente. Os extratos extraídos com método de refluxo foram os mais ativos, comparados com extratos gerados pela sonicação.

No método de refluxo, os extratos aquosos foram os mais ativos, enquanto, no método de sonicação, os extratos hidroalcoólicos exibiram maiores atividades.

### 5.14 Perfil cromatográfico

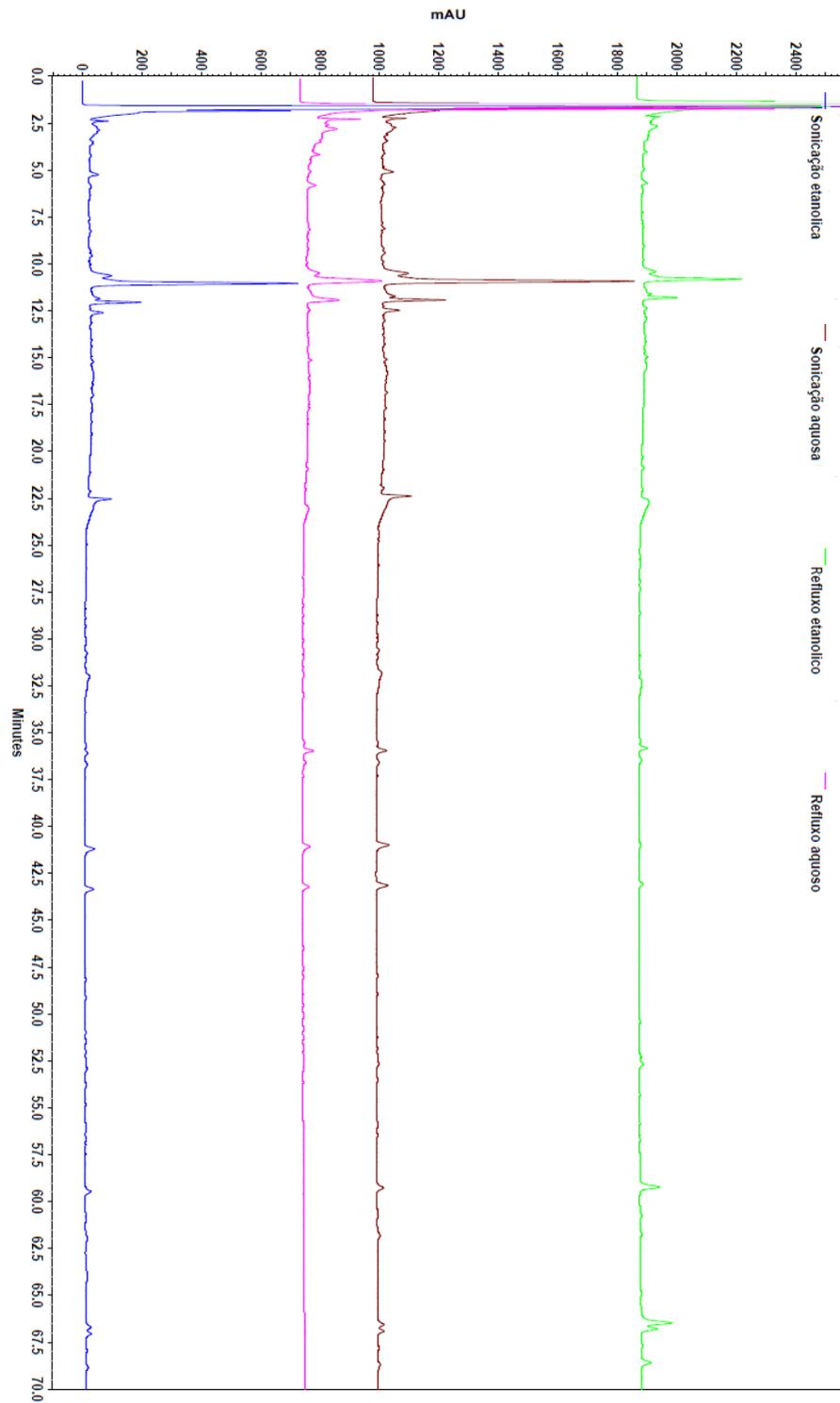
Os extratos aquosos e etanólicos 5% (p/v) foram avaliados por CLAE-FR, empregando-se condição cromatográfica em gradiente exploratório de acetonitrila (MeCN) e água, no qual a concentração de MeCN variou, linearmente, de 5% a 95%, em 65 minutos, seguido de 5 minutos de eluição isocrática a 95% de MeCN. Para a separação empregou-se coluna Zorbax Eclipse XDB-C18 (150 × 4,6 mm d.i., 5 μm) e fluxo de 1 mL/min. As análises foram realizadas a 40 °C, com detecção no comprimento de onda de 210 nm. Espectros no UV, na faixa de 205 a 400 nm, foram registrados on-line para cada pico. A utilização desse gradiente amplo possibilita a separação de grande número de constituintes presentes, obtendo-se a “impressão digital” dos extratos, a fim de caracterizar possíveis diferenças qualitativas. Os perfis cromatográficos obtidos estão representados na Figura 11.

Nos perfis cromatográficos dos extratos etanólicos e aquosos, nota-se o predomínio de picos no intervalo de 0 a 15 minutos, correspondentes às substâncias de alta polaridade. No intervalo entre 20 e 45 minutos foi observada a presença de picos cromatográficos de baixa intensidade, correspondentes a substâncias de polaridade intermediária e, entre 58 e 70 minutos, foram detectados compostos de baixa polaridade, com picos mais intensos no extrato aquoso obtido por refluxo.

Comparando-se os perfis cromatográficos dos extratos aquosos e etanólicos não se observam diferenças qualitativas marcantes entre eles. A diferença qualitativa mais evidente pode ser observada entre os extratos obtidos por refluxo. Nota-se que o refluxo etanólico foi mais efetivo para a extração de compostos apolares, caracterizados pela presença de quatro picos mais evidentes no intervalo 58 e 70 minutos.

Os perfis cromatográficos dos extratos obtidos por sonicação apresentaram alta similaridade entre si. No entanto, a sonicação com água mostrou-se mais eficiente para a extração dos constituintes polares com tempos de retenção entre 10 e 13 minutos, já que as alturas desses picos foram maiores nesse extrato em comparação ao etanólico.

Figura 11 - Perfis cromatográficos obtidos por CLAE-FR dos extratos aquoso e etanólico de *P. grandifolia* Haw.



Entretanto, vale a pena ressaltar que, na detecção por UV, empregada nas análises por CLAE-FR, a intensidade dos picos é função da absorvidade molar ( $\epsilon$ ) da substância. Assim, um pico de maior intensidade não indica, necessariamente, uma concentração maior daquele componente, a não ser que as substâncias analisadas apresentem o mesmo cromóforo (SILVERSTEIN et al., 2000). Assim, não se pode referir ao pico mais intenso do cromatograma como sendo correspondente ao componente majoritário dos extratos, uma vez que diferentes classes de compostos podem estar presentes e, portanto, diferentes cromóforos. No entanto, por se tratar do mesmo cromóforo, confirmado pela similaridade espectral dos espectros obtidos on-line no UV para os picos de retenção com 10,82 minutos para os extratos obtidos por sonicação, pode-se afirmar a maior eficiência extrativa da água para a extração desse grupo de substâncias.

### 5.15 Sensibilidade a antibióticos

A sensibilidade das cepas de *S. aureuse* de *P. aeruginosa* aos antibióticos cefalotina, gentamicina e enrofloxacina é apresentada na Tabela 6.

Tabela 6 - Sensibilidade de cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa* por diferentes antibióticos, observada pelos halos de inibição (mm).

Microrganismo	Antibióticos	Halo de inibição (mm)	Sensibilidade (mm)
<i>S. aureus</i> GL 5674	Cefalotina (30mg)	23	S>18
	Gentamicina (10mg)	20	S>20
	Enrofloxacina (5mg)	35	S>18
<i>S. aureus</i> GL 4133	Cefalotina (30mg)	35	S>18
	Gentamicina (10mg)	17	S≥15
	Enrofloxacina (5mg)	30	S>18
<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853	Cefalotina (30mg)	48	S>21
	Gentamicina (10mg)	30	S≥15
	Enrofloxacina (5mg)	5	S≥17

Com base nos dados publicados pelo CLSI (2005) foi avaliado o padrão de susceptibilidade dos microrganismos frente aos antibióticos testados. São considerados susceptíveis *S. aureus* GL 5674 que mostrem valores de halo de inibição >18 para cefalotina, >20 para gentamicina e >18 para enrofloxacina. Portanto, *S. aureus* GL 5674 foi suscetível a todos os antibióticos testados. Já para *S. aureus* GL 4133, valores de halo de inibição >18 para cefalotina, ≥15 para gentamicina e >18 para enrofloxacina classificam o microrganismo como susceptível.

Para *P. aeruginosa*, são consideradas susceptíveis as cepas que apresentarem halos de inibição >21 para cefalotina,  $\geq 15$  para gentamicina e  $\geq 17$  para enrofloxacin. Assim, a cepa utilizada, *P. aeruginosa* ATCC 25853, foi suscetível aos antibióticos cefalotina e gentamicina, e resistente ao enrofloxacin.

### 5.16 Atividades biológica dos extratos de *Pereskia grandifolia* Haw.

A atividade antimicrobiana dos extratos da *Pereskia grandifolia* Haw. foi testada sobre as cepas de *S. aureus* isoladas de vacas acometidas com mastite e *P. aeruginosa*. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 7.

Tabela 7 - Ação antibacteriana dos diferentes extratos de *Pereskia grandifolia* sobre *Pseudomonas aeruginosa* e cepas de *Staphylococcus aureus*.

Extratos	Diâmetro do halo de inibição (mm)		
	<i>S. aureus</i> GL 4133	<i>S. aureus</i> GL 5674	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853
Hidrolato	9	6	5
Aquoso (maceração)	8	6	5
Aquoso (refluxo)	10	12	5
Aquoso (sonicação)	15	10	11
Etanólico (maceração)	8	6	5
Gentamicina (10mg)	17	20	30

Por meio dos dados apresentados na Tabela 7 percebe-se que houve atividade inibitória de todos os extratos testados, para todos os microrganismos. Entre os extratos, destacou-se o aquoso por sonicação com halo de inibição de 15 mm para *S. aureus* GL 4133, 11 mm para *P. aeruginosa* e 10 mm para *S. aureus* GL 5674, seguido pelo extrato aquoso obtido por refluxo, que também apresentou halos de inibição parecidos para as cepas de *S. aureus*. O hidrolato e ambos os extratos obtidos por maceração apresentaram atividades inibitórias intermediárias.

Embora o extrato aquoso obtido por sonicação tenha apresentado resultados antimicrobianos melhores, ele apresentou quantidades de substâncias antioxidantes menores. Este resultado, observado na Tabela 4, contradiz o que era esperado, pois os fenóis presentes nos extratos também podem explicar a ação antimicrobiana.

Para o extrato de sonicação aquoso houve maior halo de inibição. Como o extrato foi preparado a partir de folhas frescas a frio, percebeu-se que houve menor extração de antioxidantes e a molécula, com o passar do tempo, degrada mais rápido. Esse resultado não é justificado pela fotoquímica.

Extratos de plantas, bem como óleos essenciais, têm demonstrado atividades antibacterianas e antifúngicas contra vários microrganismos associados à carne, incluindo as bactérias gram-negativas e gram-positivas. No entanto, geralmente, as gram-positivas são mais susceptíveis à ação dos agentes bacterianas e fúngicos, o que pode ser explicado pela diferença entre as paredes celulares, sendo que a gram-positiva não tem membrana externa (KARABAGIAS; BADEKA; KONTOMINAS, 2011).

Dentre as cepas, os halos de inibição foram menores para *P. aeruginosa*, que é gram-negativa. Assim, os constituintes químicos presentes nos extratos precisa atravessar a membrana externa para causar danos à célula e, conseqüentemente, esse microrganismo é mais resistente quando comparado com *S. aureus*, que é gram-positiva.

### 5.16.1 Determinação das concentrações mínimas bactericidas dos extratos

Além do potencial antimicrobiano de extratos de plantas provenientes da *Pereskia grandifolia* Haw., a concentração mínima bactericida (CMB) foi determinada para os microrganismos estudados. Os dados obtidos estão apresentados na Tabela 8.

Tabela 8 - Concentrações mínimas bactericidas (%) de diferentes extratos de *Pereskia grandifolia* sobre cepas de *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*

Extrato	Microrganismos		
	<i>S. aureus</i> GL4133	<i>S aureus</i> GL 5674	<i>P. aeruginosa</i> ATCC 25853
Aquoso (refluxo)	>2,5%	>2,5%	>2,5%
Etanólico (refluxo)	1,25%	0,63%	0,63%

Foram selecionados dois extratos para a determinação da CMB, sendo o extrato aquoso de refluxo, pois apresentou ação antibacteriana evidenciada pela formação do halo de inibição (Tabela 4), e o extrato etanólico por refluxo, pois apresentou melhor atividade antioxidante.

O resultado de CMB para *S. aureus* GL 4133, no meio etanólico 70%, foi de 1,25%.

Para *S. aureus* GL 5674, a CMB foi 0,625%. Já para *P. aeruginosa* foi observado CMB de 0,625%.

É possível observar, na Tabela 8, que o extrato aquoso não inibiu o crescimento de nenhuma cepa nas concentrações testadas (máximo de 2,5%).

O extrato etanólico apresentou maior teor de compostos fenólicos, superior ao do extrato aquoso, ou seja, houve maior concentração de compostos bioativos no extrato etanólico. É conhecido que os compostos fenólicos podem apresentar atividade antimicrobiana. Polifenóis podem combinar-se com as adesinas bacterianas, de forma a comprometer a adesão do microrganismo sobre a superfície celular. Dados encontrados na literatura demonstram, também, que taninos podem afetar a síntese da parede celular ao formarem complexos irreversíveis com proteínas (CHUSRI; VORAVUTHIKUNCHAI, 2009; COWAN, 1999).

## 6 CONCLUSÕES

Em relação às análises fitoquímicas, o extrato hidroetanólico obtido por refluxo apresentou maior quantidade de fenóis e flavonoides e rendimento extrativo.

Houve poucas diferenças nos perfis cromatográficos dentre os diferentes métodos extrativos de *Pereskia grandifolia*.

Todos os extratos obtidos de *Pereskia grandifolia* Haw. apresentaram atividade inibitória sobre os microrganismos estudados, tendo o extrato aquoso obtido por refluxo e por sonicação apresentado maior halo de inibição. No entanto, quando determinada a CMB, apenas o extrato hidroetanólico de ora-pro-nóbis apresentou resultado eficaz nas concentrações testadas.

Os resultados deste estudo apontam a eficácia da atividade antioxidante e antibacteriana *in vitro* dos diferentes extratos obtidos da *Pereskia grandifolia* Haw., reforçando a importância medicinal desta espécie e incentivando a busca por novos estudos.

## REFERÊNCIAS

- ABDELWAHAB, S. I. Protective mechanism of gallic acid and its novel derivative against ethanol-induced gastric ulcerogenesis: involvement of immunomodulation markers, Hsp70 and Bcl-2-associated X protein. **International Immunopharmacology**, New York, v. 16, n. 2, p. 296-305, June 2013.
- ABDUL-WAHAB I. R., GUILHON C. C., FERNANDES P. D., BOYLAN F. Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**; v. 144, n.3, p. 741–746, 2012.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; WONDRACECK, D. C.; ROCHA, W. S.; SILVA, D.B. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**, vol 34, n. 1, p. 234-238, 2012.
- AHN M.R, et al. Antioxidant activity and constituents of propolis collected in various areas of Korea. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**; v.52, n.4, p.7286-92, 2004.
- ALMEIDA, M. E. F. et al. Chemical characterization of the non conventional vegetable known as ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, Uberlândia, v. 30, n. 3, p. 431-439, 2014.
- AMAROWICZ, R.; PEGG, R. B.; RAHIMI-MOGHADDAM, P.; BARL, B.; WEIL, J. A. Free-radical scavenging capacity and antioxidant activity of selected plant species from the Canadian prairies. **Food Chemistry**, London, v. 84, p. 551-562, 2004.
- ASSIS, M. L.V. **Determinação do potencial antioxidante e quantificação de compostos fenólicos por CLAE em acessos de *Capsicum baccatum* var. *pendulum***. Dissertação apresentada ao Centro de Ciências e Tecnologias Agropecuárias da Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, 2014.
- ATAWODI, S.E. et al.. Polyphenol composition and antioxidant potential of *Hibiscus esculentus* L. fruit cultivated in Nigeria. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 6, p. 1316–1320, 2009.
- AZIZ, N.H., FARAG, S.E., MOUSA, L.A., ABO-ZAID, M.A. Comparative antibacterial and antifungal effects of some phenolic compounds. **Microbios**, Cambridge, v.93, n.374, p.43-54, 1998
- AZMIR; J. et al. Techniques for Extraction of Bioactive Compounds from Plant Materials: A Review. **Journal of Food Engineering**. London., v.117, n.4, p.426–436, 2013.
- AZWANIDA, N. N. A Review on the Extraction Methods Use in Medicinal Plants, Principle, Strength and Limitation. **Medicinal & Aromatic Plants**, New Delhi, v.4, n.3, p. 3–8, 2015.
- BERNADI, A.P.; MATOS, N.J.; MARCHIORO, M.K.; VON POSER, G.L.; RENCH, S.B. Phenolic compounds profiles during ex vitro acclimatization of micropropagated *Hypericum polyanthemum*. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 46, p. 649-690, 2008.

BERRE, L.E, FAURE, K., NGUYEN, S., PIERRE, M., ADER, F., GUERY, B. Quorum sensing: une nouvelle cible thérapeutique pour *Pseudomonas aeruginosa*? **Médecine et Maladies Infectieuses**. v. 36, p. 349-357, 2006

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição de Campinas**, Campinas, v.12, n.2, p.123-130, maio/ago, 1999.

BIBU, KJ, JOY, AD E MERCEY, KA. Therapeutic effect of ethanolic extract of *Hygrophila spinosa* T. Anders on gentamicin-induced nephrotocicity in rats. **Ondian Journal of Experimental Biology**. Vol.48, p.911-917, 2010.

BOULANOUARA, B. et al. Antioxidant activities of eight Algerian plant extracts and two essential oils. **Industrial Crops and Products**, London, v. 46, n. 1, p. 85-96, Jan. 2013.

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

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism and nutrition significance. **Nutrition Reviews**, New York, v.56, n.11, p.317-333, 1998

BRENNA, O.V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analyses of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4841-4844, 2001.

BRUGALLI I. **Alimentação alternativa: a utilização de fitoterápicos ou nutracêuticos como moduladores da imunidade e desempenho animal**. Anais do Simposio sobre Manejo e Nutrição de Aves e Suínos; 2003; Campinas, São Paulo. Brasil. Campinas: CBNA. p.167-182, 2003.

BURT, S.A. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods. **International Journal of Food Microbioloby**, v.94, p.223-253, 2004.

CARVALHO, J. L. S., CUNICO, M. M., DE DIAS, J. F. G., MIGUEL, M. D., MIGUEL, O. G. Termoestabilidade de processos extrativos de *Nasturtium officinale* R. Br., brassicaceae por sistema soxhlet modificado. **Quimica Nova**, v.32, n.4, 1031–1035, 2009.

CARVALHO, A. J. A.; FERREIRA, M. H. S.; ALVES, J. S. O licuri (*Syagrus coronata*, Arecaceae): lavoura xerófila e agricultura familiar camponesa no semiárido do centro-norte baiano. **Bahia Análise& Dados**, v. 24, n.3, p. 557-569, 2014.

CASTELLANO GONZALEZ, MARIBEL J., BERMUDEZ NAVARRO, EILYNG J., ARMINDO PEROZO MENA, LIZBETH M et al. *Staphylococcus aureus*: estado de portador en personal de enfermería y patrones de susceptibilidad antimicrobiana. **Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología** [online], v.25, n.2, p.72-78, 2005.

CAVALCANTI, Silvana Maria de Moraes et al . Estudo comparativo da prevalência de *Staphylococcus aureus* importado para as unidades de terapia intensiva de hospital universitário, Pernambuco, Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**., São Paulo, v. 9, n. 4, Dec. 2006

CHUSRI, S.; VORAVUTHIKUNCHAI, S. P. Detailed Studies on *Quercus infectoria* Olivier (Nutgalls) as an Alternative Treatment for Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Infections. **Journal of Applied Microbiology**. v. 106, n. 1, p. 89-96, 2009.

Clinical and Laboratory Standards Institute/National Committee for Clinical Laboratory Standards (CLSI/NCCLS), 2005.

CORREA, A.D; ALMEIDA, M.E.F. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.42, n.4, p.751-756, 2012.

COUTINHO, H. D. M, et al. Herbal therapy associated with antibiotic therapy: potentiation of the antibiotic activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* by *Turnera ulmifolia* L. **BMCComplementary Alternative Medicine**, p. 9-13, 2009.

COWAN, M. M. Plant Products as Antimicrobial Agents. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 12, n. 4, p. 564-582, 1999.

DE LIMA, S. R.; DE OLIVEIRA, G. S.; DE MORAIS, S. A. L.; DO NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Estudo dos constituintes macromoleculares, extrativos voláteis e compostos fenólicos da madeira de candeia - *Moquinia polymorpha* (LESS.) DC. **Ciência Florestal – Revista da Universidade Federal de Santa Maria**, v. 17, n. 2, p. 145-155, 2007.

DEY, Y., et al. A phytopharmacological review on an important medicinal plant - *Amorphophallus paeoniifolius*. **An International Quarterly Journal of Research in Ayurveda**, v.33, n.1, p.27-32, 2012.

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**, v.16, n.3, p.279-284, 2005.

DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 80, n. S1, p. S77-S112, 1998.

DORMAN, H. J. D. et al. Antioxidant properties and composition of aqueous extracts from *Mentha* species, hybrids, varieties, and cultivars. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 16, p. 4563-4569, Sept. 2003.

DUARTE-ALMEIDA, J.M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema B-caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.26, n.2, p.446-452, jun., 2006.

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

DUTRA, F. L. G.; RIBANI, R. H.. Determinação de Compostos Fenólicos por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência Isocrática Durante Estacionamento da Erva-mate. **Química Nova**, v. 33, n. 1, p. 119-123.

EDWARDS, E. J; DONOGHUE, M. *Pereskia* and the Origin of the Cactus Life-Form. **The americannaturalist**.v.167, p.777-793, 2006.

EREIFEJ, KHALIL,I. et al. Effect of Extractant and Temperature on Phenolic Compounds and Antioxidant Activity of Selected Spices. **Food and Nutrition Sciences**, Irvine, v.7, p.362–70, April, 2016.

FARAGO, P.V. et al. Atividade antibacteriana de óleos essenciais de *Ocimum selloi* Benth. (*Lamiaceae*). Publicatio UEPG: **Ciências Biológicas e da Saúde**, v.10, n.4, p.59-63, 2004.

FARAH, A.; DONANGELO, C.M. Phenolic compounds in coffee. **Brazilian Journal of Plant Physiology**, v.18, p.23-26, 2006.

FENNEMA O. R. **Química de los alimentos**. 2 ed. Zaragoza: Acribia, 2000.

FERNANDEZ, M.A., SAENZ, M.T., GARCIA, M.D. Antiinflammatory activity in rats and mice of phenolic acids isolated from *Scrophularia frutescens*. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, London, v.50, n.10, p.1183-1186, 1998.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**. Londrina, v. 12, p.175-204, 2000.

FERREIRA, H; ELIENE, R. P. *Pseudomonas aeruginosa*: Um alerta aos profissionais de saúde. **Revista Pan-americana Infectologia**, v.12, p.44-50, 2010.

FERREIRA, M.M.M.; OLIVEIRA, A.H.C.; SANTOS, N.S. Flavonas e flavonóis: novas descobertas sobre sua estrutura química e função biológica. **Revista Agro@mbiente On Line**, v.2, n.2, p.57-60, 2008.

FRANCO, B.; LANDGRAF, M. **Microbiologia dos alimentos**. São Paulo: Ateneu, 2008. 182 p.

GARRITY, G. M. Bergey's manual of systematic bacteriology: the low G+C gram positives. **New York: Springer-Verlang**, 2006. v. 3, 721 p.

FRANKEL E. N & MEYER A. S. The problems of using one-dimensional methods to evaluate multifunctional food and biological antioxidants. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 80::1925-1941, 2000.

GAMACHE, P., RYAN, E., ACWORTH, I.N. Analysis of phenolic and flavonoid compounds in juice beverages using high-performance liquid chromatography with coulometric array detection. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v.635, n.1, p.143-150, 1993.

GELATTI, Luciane Cristina et al .Sepse por *Staphylococcus aureus* resistente à metilina adquirida na comunidade no sul do Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**., Uberaba, v. 42, n. 4, Aug. 2009

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.

GÓMEZ-PLAZA, E; MIÑANO, A, LÓPEZ-ROCA, JM. Comparison of Chromatic Properties, Stability and Antioxidant Capacity of Anthocyanin-Based Aqueous Extracts from Grape Pomace Obtained from Different Vinification Methods. **Food Chemistry**, Berlin, v.97, n.1, p. 87–94, 2006.

GORDON, M. H. The mechanism of antioxidant action in vitro. In: HUDSON, B. J. F. (Ed.). **Food antioxidants**. London: Elsevier Applied Science, 1990. p. 1–18.

GUIMARÃES, D.O; MOMESSO, L.S; PUPO, M.T, Antibiotics: therapeutic importance and perspectives for the discovery and development of new agentes, **Química Nova**, v.33, n.3, São Paulo, 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. **Free radicals in biology and medicine**. 3 ed. Clarendon, Oxford, 2000. 936 p.

HAVSTEEN BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Farmacology & Therapeutics**, 96:67-202, 2002.

HOLLMAN, P.C., KATAN, M.B. Bioavailability and health effects of dietary flavonoids in man. **Archives of Toxicology Supplement**, Berlin, v.20, p.237-248, 1998.

HUBER. L. S.; B. RODRIGUEZ. A. D.; I. RODRIGUES. M.; 2007, Otimização e validação de metodologia analítica para determinação de flavonóis e flavonas por CLAE em hortaliças. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, v.66, n.2, p.142-151.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V. I. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chemistry**, v.126, p.1821–1835, 2011.

ISAI, M. et al., Prevention of selenite-induced cataractogenesis by rutin in Wistar rats. **Molecular Vision**, v. 15, p. 2570-2577, 2009.

IVANOVA, A., MILKOVA, T., GALABOV, A.S., NIKOLAEVA, L., VOYNOVA, E. Transformation of cholanic acid derivatives into pharmacologically active esters of phenolic acids by heterogeneous **Wittig reaction**. **Zeitschrift fuer Naturforschung**, Tuebingen, v.52, n.7-8, p.516-521, 1997

JUNIOR, A. et al. Cromatografia de troca-iônica aplicada ao isolamento da fração ácida do óleo de cabaíba e da sacaca, **Química Nova**, v.28, n.4, p. 719-722 2005

KALOGEROPOULOS N, KONTELES SJ, TROULLIDOU E, MOURTIZINOS I, KARATHANOS VT. Chemical composition, antioxidant activity and antimicrobial properties of propolis extracts from Greece and Cyprus. **Food Chemistry**; v.116, n.2, p.452-61, 2009.

Kamel C. A novel look at a classic approach of plant extracts. *Feed Mix- The International Journal on Feed*, **Nutrition and Technology** 2000.

KNEKT P.; JARVINEN R.; REUNANEN A.; MAATELA J. Flavonoid intake and coronary mortality in Finland: a cohort study. **British Medical Bulletin** ; v.312, p.478-81, 1998.

- KARABAGIAS I., BADEKA, A., KONTOMINAS, M.G. Shelf life extension of lamb meat using thyme or oregano essential oils and modified atmosphere packaging. **Meat Science**, v.88, n.1, p.109-116, 2011.
- KAZAMA, C. C. et al. Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v.144, p.86-93, 2012.
- KLEIN T, et al. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista Ciência Farmacológica Básica Aplicada**. v.30, n.3, p.241-248, 2009.
- KUMAR, S.; PANDEY, A. K. Chemistry and Biological Activities of Flavonoids: An Overview. **The Scientific World Journal**, Cairo, p.1–16, 2013.
- LEAL, P. F. et al. Functional properties of spices extracts obtained via supercritical fluid extraction. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 51, n. 9, p. 2520-2525, 2003.
- LINK, D. LOPES, J.M.D.C. Implantação de um horto didático de plantas bioativas no município de tupanciretã. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v.2, n.2, p.225-250, 2011.
- LIU, R.H. Health benefits of fruit and vegetables are from additive and synergistic combinations of phytochemicals. **The American Journal of Clinical Nutrition**; v.78, p.517-520, 2003.
- LOPES, C.R. et al. Folhas de chá. Viçosa: UFV, 2005.
- LORDÉLLO, D. M. S. **Disponibilidade hídrica no crescimento, acúmulo e composição química do óleo essencial de *Mentha piperita* e estudo comparativo de atividades antioxidantes em espécies de mentas**. Dissertação apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Fitotecnia, 2015.
- LOULI V.; RAGOUSSIS N.; MAGOULAS. K. Recovery of phenolic antioxidants from wine industry by-products. **Bioresource Technology**, v.92, p.201-208, 2005.
- LOZIENE, K., et al. Radical scavenging and antibacterial properties of the extracts from different *Thymus ulegioides* L. chemotypes. **Food Chemistry**, v.103, p.546-559, 2007.
- MAKRIS, D. P.; ROSSITER, J. T. Domestic processing of onion bulbs (*Allium cepa*) and asparagus spears (*Asparagus officinalis*): Effect on flavonol content and antioxidant status. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v.49, p. 3216-3222, 2001.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005
- MARRA, R.A, BAR, K., BEARMAN, G.M.L., WENZEL, R.P., EDMOND, M.B. Systemic inflammatory response syndrome in adult patients with nosocomial bloodstream infection due to *Pseudomonas aeruginosa*. **Journal of Infection**. v. 53, p. 30-35, 2006

- MATIAS E.F.F. et al. Enhancement of Antibiotic Activity by *Cordia verbenácea* DC. **Latin American Journal of Pharmacy**.v.29, n.6, p.1049-1052, 2010.
- MERCÊ, A.L.R. et al. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and  $\text{Co}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ , and  $\text{Ni}^{2+}$ . **Bioresource Techonology**, v.76, n.1, p.29-37, 2001.
- MIEAN, K.H, MOHAMED, S. Flavonoid (myricetin, quercetin, kaempferol, luteolin, and apigenin) content of edible tropical plants. **The Journal of Agricultural and Food Chemistry** .v.49, n.6, p.3106-12, 2001.
- MIGUEL, M. et al. Antioxidant and anti-inflammatory activities of essential oils: a short review. **Molecules**, Washington, v. 15, n. 12, p. 9252-9287, Dec. 2010.
- MIGUEL, M. et al. Antioxidant, anti-inflammatory and antiacetylcholinesterase activities of eleven extracts of moroccan plants. **Fresenius Environmental Bulletin**, Washington, v. 6, n. 24, p. 1-14, Feb. 2014.
- MOKRANI, A. et al. Phenolic Contents and Bioactive Potential of Peach Fruit Extracts.**Food Chemistry**, Berlin, v.202, p.212–20, 2016.
- MOURA, Josely Pinto de et al. Resistência à mupirocina entre isolados de *Staphylococcus aureus* de profissionais de enfermagem. **Acta Paulista de Enfermagem**, São Paulo, v. 23, n. 3, June 2010
- MOREIRA L, DIAS LG, PEREIRA JA, ESTEVINHO L. Antioxidant properties, total phenols and pollen analysis of própolis samples from Portugal. **Food and Chemical Toxicology (FCT)**; v.46, n.11, p.3482-5, 2008.
- MUNHOZ, V.M.; LONGHINI, RENATA; SOUZA, J.R.P.; ZEQUI, J. A. C. ; Leite-Mello, Eneri V. S.; Lopes, G. C.; Mello, João Carlos Palazzo de . Extraction of flavonoids from *Tagetes patula*: process optimization and screening for biological activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia(Impresso)**, v. 24, p. 576-583, 2014
- NAGAI T.; REIJI I.; HACHIRO I.; NOBUTAKA S. Preparation and antioxidant properties of water extract of propolis. **Food Chemistry**, v.80, p.29–33, 2003.
- NAGEM, T.J.; ALBUQUERQUE, T.T.O.; MIRANDA, L.C.G. Ácidos fenólicos em cultivares de soja: ação antioxidante. **Arquivos de Biologia e Tecnologia**, Curitiba, v.35, n.1, p.129-138, 1992.
- NARDIN, P.; GUTERRES, S. Alfa-Hidroxiácidos: aplicações cosméticas e dermatológicas. **Caderno de Farmácia**, v.15, p.7-14, 1999.
- NCCLS (National Committee for Clinical Laboratory Standards), 2006.
- NEVES, M. J. et al. Actividade antioxidante avaliação in vitro da citotoxicidade de extratos aquosos de folhas de *Mentha piperita*. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, Porto, v. 6, n. 1, p. 344-354, Apr. 2009.

NOSTRO, A. et al. Susceptibility of methicillin-resistant staphylococci to oregano essential oil, carvacrol and thymol. **FEMS Microbiology Letters**, p. 191-195, 2004.

NURESTRI, A.M.S. et al. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) leaves. **Journal of Biological Sciences**, v.9, n.5, p.488-493, 2009

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, Abr./Jun. 2008.

OYAIZU, M. Studies on Products of Browning Reaction. Antioxidative Activities of Products of Browning Reaction Prepared from Glucosamine. **The Japanese Journal of Nutrition and Dietetics**, Tokyo, v.44, n.17, p.307-15, May, 1986.

PARK, Y. K.; IKEGAKI, M.; ABREU, J. A. S.; ALCICI, N. M. F. Estudo da preparação dos extratos de própolis e suas aplicações. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 18, n. 3, 1998.

PECIVOVÁ, J. et al., Quercetin inhibits degranulation and superoxide generation in PMA stimulated neutrophils. **Interdisciplinary Toxicology**, v. 5, n. 2, p. 81- 83, 2012.

PEDRIALI, C. A., **Síntese química de derivados hidrossolúveis da rutina: determinação de suas propriedades físico-químicas e avaliação de suas atividades antioxidantes.** Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Departamento de Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica. Universidade de São Paulo, São Paulo, 2005

PELEG, H., BODINE, K.K., NOBLE, A.C. The influence of acid on adstringency of alum and phenolic compounds. **Chemical Senses**, Oxford, v.23, n.3, p.371-378, 1998

PEREIRA OL, BARRETO RW, CAVALLAZZI JRP, BRAUN U. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* in Brazil, with comments on the life-cycle of *Uromyces pereskiae*. **Fungal Diversity** 25: 127-140, 2007.

PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Research International**, v.39, p.791-800, 2006.

PINELO M., DEL Fabbro P.; MANZOCCO L., NUÑEZ M. J.; NICOLI M. C. Optimization of continuous phenol extraction from *Vitis vinifera* by-products. **Food Chemistry**, 92, 109-117, 2005.

PHILIP, K. et al. Antimicrobial activity of some medicinal plants from Malaysia. **American Journal of Applied Sciences**, New York, v. 6, n. 8, p. 1613-1617, 2009.

PIN-DER-DUH, X. Antioxidant activity of burdock (*Arctium lappa* Linne): its scavenging effect on free-radical and active oxygen. **Journal of the American Oil Chemists Society**, Chicago, v. 75, n. 4, p. 455-461, Oct. 1998.

- PINTO, N. D. C; SCIO, E. The biological activities and chemical composition of *Pereskia* species (Cactaceae) - a review **Plant Foods for Human Nutrition**, v.69, 189-195, 2014
- PONTIS, J.A. et al. Color, Phenolic and Flavonoid Content, and Antioxidant Activity of Honey from Roraima, Brazil. **Food Science and Technology**, Campinas, v.34, n.1, p.69–73, 2014.
- POPOVA, M., BANKOVA, V., BUTOVSKA, D., PETKOV, V., DAMYANOVA, B. N., SABATINI, A. G., MARCAZZAN, G. L., BOGDANOV, S. Validated methods for the quantification of biologically active constituents of poplar-type propolis. **Phytochemical Analysis**, 15, 235-240, 2004.
- PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a Phosphomolybdenum Complex: specific application to the determination of vitamin E. **Analytical Biochemistry**, v.269, p.337-341, 1999.
- QUEIROZ, C. R. A. D. A., et al. Growing *Pereskia aculeata* under intermittent irrigation according to levels of matric potential reduction. **Pesquisa Agropecuaria Tropical**, v.45, p.1-8, 2015.
- RAHMAT, A.K. et al., Protective effects of rutin against potassium bromate induced nephrotoxicity in rats. **BMC Complement Altern Med**, v. 12, p. 204, 2012.
- RAMOS-E-SILVA, M. et al. Hydroxy acids and retinoids in cosmetics. **Clinics in Dermatology**, v.19, p.460-466.
- RAZERA, Fernanda et al . CA-MRSA em furunculose: relato de caso do sul do Brasil. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro, v. 84, n. 5, Oct. 2009
- REBUGLIO J.; C. et al., Antioxidant and cytotoxic studies for kaempferol, quercetin and 38 isoquercitrin. **Eclética Química**. vol.36 nº 2 São Paulo, 2011.
- REHMAN, Z.; HABIB, F.; SHAH, W. H. Utilization of potato peels extract as a natural antioxidant in soy bean oil. **Food Chemistry**, London, v. 85, n. 2, p. 215-220, 2004.
- REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, Honolulu, v. 3, p. 25-35, 2005.
- ROCHA, D.R.C. et al. Macarrão adicionado de *ora-pro-nobis* (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n.4, p.459-465, 2008.
- ROGERIO AP.; FONTANARI C.; BORDUCCHI E.; Keller AC, RUSSO M.; SOARES E.G.; ALBUQUERQUE D.A.; FACCIOLI L.H.; Anti-inflammatory effects of *Lafoensia pacari* and ellagic acid in a murine model of asthma. **European Journal of Pharmacology**, v.580, p.262-270, 2007.
- 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.

RUI-LI LIU et al.. Hyperoside protects cortical neurons from oxygen-glucose deprivation-reperfusion induced injury via nitric oxide signal pathway. **Brain Research**, v.1469, p.164-173, August, 2012.

SANTOS, André Luis dos et al. Staphylococcus aureus: visitando uma cepa de importância hospitalar. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial (JBPML)**, Rio de Janeiro, v. 43, n. 6, Dec. 2007

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: SIMÕES, C. M. C. (Org) et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre/Florianópolis: Ed. Universidade/UFRGS / Ed. da UFSC. p. 323-354, 1999.

SCHWOB, I.; BESSIERE, J. M.; MASOTTI, V.; VIANO, J. Changes in essential oil composition in Saint Jhon's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. **Biochem. Biochemical Systematics and Ecology**, v.32, p. 735-774, 2004.

SHAHIDI, F; NACZK, M. In: ÖTLES, S. Methods of analysis of food components and additives. **Boca Raton: CRC Press**, 2005, p. 199-260.

SHARIF, K. M. et al. Experimental design of supercritical fluid extraction: a review. **Journal of Food Engineering**, Essex, v. 124, p. 105–116, Mar. 2014.

SIEW, Y. Y. et al. Ethnobotanical survey of usage of fresh medicinal plants in Singapore. **Journal of Ethnopharmacology**, v.155, p. 1450-1466, 2014.

SIGER, A.; et al. Antioxidant activity and phenolic content in three lupin species. **Journal of Food Composition and Analysis**.v.25, n.2, p.190–197, 2012.

SIM, K.S. et al. Acute oral toxicity of *Pereskia bleo* and *Pereskia grandifolia* in mice. **Pharmacognosy Magazine**, v.6, n.21, p.67-70, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: Da planta ao medicamento**. 6. ed. Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/ Universidade Federal do Rio Grande do Sul/ Da Universidade Federal de Santa Catarina, 2010, 1102 p.

SLINKARD K, SINGLETON V.L. Total phenol analyses: Automation and Comparison with Manual Methods. **American Journal of Enology and Viticulture (AJEV)**.v.28, p.49-55, 1977.

SILVA, S.; et al. Identificação de glicósídeos de flavonóis em subprodutos da vinificação por HPLC com diferentes detectores e hifenado com espectrometria de massa. **Ciência e Tecnologia**; v.20, n.1, p.17-33, 2005.

SOARES, D.G., ANDREAZZA, A.C, SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.41, n.1, p.95-100, 2005.

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

SCHERER, R.; GODOY, HT. Effects of Extraction Methods of Phenolic Compounds from *Xanthium Strumarium* L. and Their Antioxidant Activity. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, Botucatu, v.16, p.41-46, 2014.

SHI, J. et al. Polyphenolics in Grape Seeds-Biochemistry and Functionality. **Journal of medicinal food**, Larchmont , v.6, n4, p.291-99, 2003.

SIM, K. S. et al. Acute Oral Toxicity of *Pereskia Bleo* and *Pereskia Grandifolia* in Mice.” **Pharmacognosy magazine**, India, v.6, n.21, p.67-70.

SINGLETON, V. L. et al. Analysis of Total Phenols and Other Oxidation Substrates and Antioxidants by Means of Folin-Ciocalteu Reagent. **Methods in Enzymology**, p.152-78, 1999.

SOUZA, L.F. **Aspectos fitotécnicos, bromatológicos e componentes bioativos de *Pereskia aculeata*, *Pereskia grandifolia* e *Anredera corifolia***. Dissertação de Mestrado de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Rio Grande do Sul, 2014.

SOUZA, M. C., SARTOR, C. F. P., FELIPE, D. F. Desenvolvimento de cápsulas contendo extrato de *Pereskia aculeata*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v.6, p.461-477, 2013.

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

SPAGOLLA, L. C.; SANTOS, M. M.; PASSOS, L. M. L.; AGUIAR, C. L. Extração alcoólica de fenólicos e flavonóides totais de mirtilo “Rabbiteye” (*Vaccinium ashei*) e sua atividade antioxidante. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 30, n. 2, p. 187-191, 2009.

STALIKAS, Constantine D. Extraction, separation e detection methods for phenolic acid and flavonoids. **Journal of Separation Science**. v. 30, n. 18, p. 3268 - 3295, Dec, 2007.

SUDAN, R. et al. Iron (FeII) Chelation, Ferric Reducing Antioxidant Power, and Immune Modulating Potential of *Arisaema Jacquemontii* (Himalayan Cobra Lily). **Bio Med Research International**, New York , p. 1-7. 2014.

SUN, T. et al.. Microwave accelerated transglycosylation of rutin by cyclodextrin glucanase transferase from *Bacillus* sp. SK 13.002. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 12, n. 6, p. 3786-3796, 2011.

SPEMCKER, J.P. et al. Biomarkers of the intake of dietary polyphenols: strengths, limitations and application in nutrition research. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v.99, n.1, p.12-22, Aug, 2007.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed, 2009, 820p.

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

THOMPSON, J., O'CONNOR, M., MILLS, J.A., DAHLBERG, A.E. The protein synthesis inhibitors, oxazolidinones and chloramphenicol, cause extensive translational inaccuracy in vivo. **Journal of Molecular Biology**. v. 322, p. 273-279, 2002

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.

TASIOULA-MARGARI, M.; TSABOLATIDOU, E. Extraction, Separation, and Identification of Phenolic Compounds in Virgin Olive Oil by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Antioxidants**, Switzerland, v.4, n.3, p.548-62, 2015.

URIBE, E. et al. Extraction Techniques for Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity Determination of Chilean Papaya (*Vasconcellea Pubescens*) Fruit. **Journal of Chemistry**, New York, p.1-8, 2015.

VELIOGLU, Y. S.; NAZZA, G.; GAO, L.; OOMAH, B. D. Antioxidant activity and total phenolics in selected fruits, vegetables, and grain products. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 46, n. 10, p. 4113-4117, 1998.

VERHOEFF J, et al. A Dutch approach to methicillin-resistance *Staphylococcus aureus*. **European Journal of Clinical Microbiology**, v.18, n.7, p.461-466, 1999.

VESSALA, M., HEMMATIA, M. VASEI, M. Antidiabetic effects of quercetin in streptozocin-induced diabetic rats. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.135, p.357-364, 2003.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A.A. Determination of antioxidant and antimicrobial activities of *Rumex crispus* L. extracts. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Chicago: v.49, p. 4083-4089, 2001.

ZAREISEDEHIZADEH, S., TAN, C. H.; KOH, H. L. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2014.

ZHENG, W.; WANG, S.Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.49, p. 5165 - 5170, 2001.

ZIDORN, C.; STUPPNER, H. Evaluation of chemo systematic characters in the genus *Leontodon*. **Taxon**, v.50, p.115-133, 2001.

ZUANAZZI J.A.S, MONTANHA J.A. Flavonóides. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR (org.) **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 5. ed. rev. ampl. Florianópolis: Ed. da UFSC; Porto Alegre: Ed. da UFRGS, p.577-614, 2004.

WANG., G et al., Effects of quercetin nanoliposomes on C6 glioma cells through induction of type III programmed cell death. **International Journal of Nanomedicine**. v. 7, p, 271- 280, 2012.

WILDMAN, R. E. C.; KELLEY, M. In: WILDMAN, R. Handbook of nutraceuticals and functional foods. **Boca Raton: CRC Press**, 2007, p. 1-21.