

BIOPROSPECÇÃO FITOQUÍMICA, AVALIAÇÃO DO POTENCIAL DA ATIVIDADE ANTIFÚNGICA ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata*)

Grece Helen Gonçalves de Oliveira¹
Alessandra Duarte Rocha²

RESUMO: A ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) é uma hortaliça não convencional que se destaca por apresentar propriedades nutricionais e terapêuticas conhecidas. Suas folhas são ricas em vitaminas, proteínas, fibras, minerais e metabólitos secundários apresentando um grande potencial bioativo. O objetivo geral deste trabalho foi realizar a prospecção fitoquímica dos principais metabólitos secundários relatados na literatura e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de extratos preparados a partir das folhas da ora-pro-nóbis cultivada na horta da Faculdade Ciências da Vida. Os ensaios de prospecção fitoquímica foram realizados segundo descrito na literatura (BRASIL, 2019; COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2017) e, nas condições avaliadas, foi possível identificar, nos extratos testados, os ativos taninos, flavonoides e saponinas. A determinação da atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso foi realizada pelo método da microdiluição (CLSI, 2017), onde foi observado perfil de sensibilidade para *Candida albicans*, *Cryptococcus gatti* e *C. neoformans* quando expostas à presença do extrato etanólico, o que demonstra a presença de moléculas bioativas com atividade antifúngica em *Pereskia aculeata*., mostrando que a ora-pro-nóbis pode ter notável aplicação na terapêutica de infecções desta natureza.

Palavras-chave: Ora-pro-nóbis; *Pereskia aculeata*; Bioprospecção; Metabólitos secundários; Atividade antifúngica.

ABSTRACT: The ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) is an unconventional vegetable that stands out for having known nutritional and therapeutic properties. Its leaves are rich in vitamins, proteins, fibers, minerals and secondary metabolites with great bioactive potential. The general objective of this work was to carry out the phytochemical prospecting of the main secondary metabolites reported in the literature and to evaluate the *in vitro* antifungal activity of extracts prepared from the leaves of the ora-pro-nobis cultivated in the vegetable garden of the Faculdade Ciências da Vida. The phytochemical prospecting tests were performed as described in the literature (BRASIL, 2019; COSTA, 2002; SIMÕES *et al.*, 2017) and, under the conditions evaluated, it was possible to identify, in the tested extracts, the active tannins, flavonoids and saponins. saponins, flavonoids, tannins. The determination of the antifungal activity of the ethanolic and aqueous extracts was carried out using the microdilution method (CLSI, 2017), where susceptible microorganisms from *Candida albicans*, *Cryptococcus gatti* and *C. neoformans* and the results indicated that the samples had relevant antifungal potential, showing that the ora-pro-nobis can have a remarkable application in the treatment of infections of this nature.

Key-words: Ora-pro-nóbis; *Pereskia aculeata*; Bioprospection; Secondary metabolites; Antifungal activity.

¹ Discente do curso de graduação em Farmácia da Faculdade Ciências da Vida (FCV) - Sete Lagoas/MG; E-mail: grecehelen19@gmail.com.

² Farmacêutica Industrial; Mestre em Ciências Farmacêuticas e Doutora em Química pela UFMG; Docente no Curso de Graduação em Farmácia da Faculdade Ciências da Vida (FCV) - Sete Lagoas/MG. Orientadora da pesquisa. E-mail: aledrocha2004@yahoo.com.br.

1 INTRODUÇÃO

O Brasil apresenta a maior diversidade vegetal do mundo, no entanto, ainda existem poucos estudos químicos farmacológicos associados à nossa flora. As plantas, além de serem utilizadas na medicina popular, são fontes importantes de obtenção de compostos bioativos que são amplamente utilizados em indústrias cosméticas, agrícolas, de alimentos e no tratamento de numerosas doenças (PEREIRA, 2009).

É fundamental enfatizar a importância da bioprospecção de produtos naturais, e analisar os benefícios que podem ser trazidos através da exploração e pesquisa de recursos da fauna e flora, a fim de identificar ingredientes ativos para obter novos produtos e processos em prol a comercialização (ALMEIDA, 2006).

O interesse na busca de substâncias bioativas antimicrobianas produzidas por animais, plantas e microrganismos vêm aumentando nos últimos tempos. Esse interesse é, em parte, devido ao aumento do número de microrganismos resistentes aos vários medicamentos utilizados no tratamento de doenças infecciosas, o que impulsiona estudos para o desenvolvimento de novos medicamentos efetivos (ALMEIDA, 2006).

Nesse sentido, a pesquisa de plantas medicinais que apresentem atividade antifúngica se mostra essencialmente importante, à medida que pode levar à descoberta substâncias ou extratos que sejam eficientes no tratamento de infecções provocadas por esses microrganismos. Este tipo de pesquisa, fornece dados científicos que podem validar terapias alternativas a serem implementadas no sistema de saúde pública e auxilia na melhoria do cenário brasileiro de pesquisa de drogas fitoterapêuticas (BRASILEIRO, 2008).

Desse modo, tem-se como problema de pesquisa: a espécie vegetal ora- pro-nóbis, do Espaço Plantare da FCV, apresenta, em sua constituição, quais componentes majoritários e exibe ação antifúngica? O estudo justifica-se uma vez que o interesse nas plantas vem aumentando devido ao potencial de propriedades medicinais relatadas pelo uso tradicional e que precisam ser comprovadas por estudos científicos. A promoção de um maior conhecimento sobre as plantas, como a ora- pro-nóbis, traz uma maior confiabilidade para a sua utilização.

O estudo partiu da seguinte hipótese: uma planta do cerrado brasileiro, rica em fibras e sais minerais, consumida pela população como alimentícia, poderia apresentar também alguma atividade medicinal, especificamente ação antifúngica, devido à existência de metabólitos secundários bioativos em suas folhas.

O objetivo geral deste trabalho foi realizar a prospecção fitoquímica e avaliar a atividade antifúngica *in vitro* de uma espécie vegetal cultivada na horta da Faculdade Ciências da Vida: a ora- pro-nóbis (*Pereskia aculeata*). Como objetivos específicos propuseram-se avaliar a pureza de uma amostra da droga vegetal, através da aplicação de ensaios de determinação de umidade e cinzas; preparar extratos aquosos e etanólicos da espécie vegetal da horta da Faculdade Ciências da Vida para caracterizar seu perfil químico de componentes majoritários e avaliar a sua atividade antifúngica *in vitro*.

Metodologicamente, o presente estudo adequa-se como pesquisa de campo, de natureza descritiva e quantitativa quanto à sua abordagem, sendo elaborada a partir de pesquisa bibliográfica realizada em literatura especializada nas bases de dados do Google Acadêmico, Pubmed e *Scientific Eletronic Library Online* (SciELO). A parte prática relacionada ao preparo de extratos e à prospecção fitoquímica foi realizada nos laboratórios de Química da Faculdade Ciências da Vida e fez-se a avaliação da atividade antifúngica *in vitro* dos extratos no laboratório de Micologia do ICB-UFMG.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Bioprospecção fitoquímica e de atividade antifúngica

A origem do conhecimento das plantas pelo homem é confundida com sua própria história. Há vegetais de milênios que têm sido usados, ao longo do tempo, pelos seres humanos no tratamento de doenças. A utilização de plantas medicinais mostra melhorias na qualidade de vida de comunidades de baixa renda por causa de sua alta disponibilidade, moderada toxicidade, risco mínimo de efeitos adversos e principalmente baixos custos em comparação com drogas alopáticas (CASTRO & FIGUEIREDO, 2019).

Estudos científicos que associam as plantas às suas diversas propriedades medicinais, incluindo atividades antibacterianas ou antifúngicas, estão entre os mais relevantes e a busca por substâncias bioativas não é um novo emprego na história da humanidade, uma vez que o homem experimenta os recursos biológicos naturais disponíveis na natureza e recebe desses recursos, novos objetos, utensílios e medicamentos para sua vida diária (CASTRO & FIGUEIREDO, 2019).

De acordo com Saccaro Junior (2011), a bioprospecção pode ser definida como a busca sistemática de organismos, genes, enzimas, compostos, processos e partes dos seres vivos, que têm um potencial econômico e, finalmente, o desenvolvimento de um produto.

As atividades bioprospectivas podem ser entendidas como levantamentos de recursos biológicos (consistindo de produtos genéticos) e/ou derivativos (aromas, por exemplo) com exploração comercial para indústria química, farmacêutica, cosméticos ou alimentar. Tais pesquisas podem surgir do acesso ao patrimônio genético e/ou do conhecimento tradicional associado (SACCARO JUNIOR, 2011).

Nessa mesma linha de entendimento, a bioprospecção se encontra expressa no Art. 7º, Inc. VII, da MP 2.186-16/01, que a define como a “atividade exploratória que visa identificar elementos da diversidade genética e informações sobre conhecimentos tradicionais associados, com potencial de uso comercial”. Na instância federal, destaca-se a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada também em 2006 por decreto presidencial, com diretrizes e ações para toda a cadeia produtiva de plantas medicinais e fitoterápicos (BRASIL, 2012).

De acordo com as informações de Moraes e colaboradores (2019), vários estudos foram feitos para quantificar e qualificar os componentes químicos dos extratos vegetais, cujos efeitos benéficos de certas substâncias de certas espécies, servem como um fator chave para o desenvolvimento de pesquisas básicas para futuras aplicações desses bioativos. O emprego de plantas medicinais é um método terapêutico/alternativo com crescente aceitação da comunidade científica, sobretudo, devido aos resultados de estudos científicos que comprovam a sua segurança e eficácia (KINGHORN, 2001).

Entre os métodos de pesquisa, a análise fitoquímica preliminar se refere ao reconhecimento de constituintes químicos presentes na espécie. Quando ainda não há estudo químico sobre uma espécie específica e seus metabólitos secundários, a abordagem fitoquímica preliminar atua como um método para identificar a presença de várias classes de metabólitos primários e secundários. Esse processo pode ser realizado por diferentes métodos e solventes, resultando em uma ampla variedade de resultados (CASTRO & FIGUEIREDO, 2019).

O processo de detecção, informação da atividade farmacológica e identificação das espécies medicinais nativas do Cerrado, bem como de seus constituintes bioativos, é importante e mostra o potencial econômico e médico das plantas desse bioma (SILVA *et al.*, 2010).

O uso das plantas medicinais, nos países em desenvolvimento, tem sido amplamente observado como base normativa para a manutenção da saúde. Estima-se que, no Brasil, 40% dos medicamentos atualmente disponíveis foram desenvolvidos através de fontes naturais (BRASIL, 2012).

Venturoso (2011) relata que as plantas medicinais apresentam grande riqueza química e representam possíveis fontes de moléculas ativas microbidas, que podem ser usadas na defesa das plantas contra os fitopatógenos. Estes compostos bioativos pertencem a várias classes de substâncias químicas, tais como alcaloides, terpenos, lignanas, flavonoides, cumarinas, quinonas, xantonas, lactonas e esteroides, entre outras.

Os taninos constituem uma importante composição de óleos essenciais, agentes antibacterianos, antioxidantes e antifúngicos. Este metabólito está envolvido no mecanismo de defesa das plantas contra ataque a insetos, bactérias, fungos entre outros, ao sofrer ataque de insetos a planta libera substâncias de sabor adstringente ao paladar dos animais, característica associada às glicoproteínas salivares presentes no tanino (KUPSKA, *et al.*, 2014).

A pesquisa fitoquímica é considerada importante, principalmente quando todos os estudos químicos com espécies de interesse popular ainda não estão organizados, conhecer os compostos químicos de espécies vegetais e avaliar sua presença neles, identificando metabólitos secundários relevantes, como marcadores químicos de plantas medicinais no processo de domesticação, na qualidade da matéria-prima médica e à perspectiva de biodiversidade ou bioprospecção (SIMÕES *et al.*, 2004; MACIEL, 2002).

Estudos biomonitorados por ensaios de atividade biológica *in vitro* são uma tendência crescente na pesquisa fitoquímica atual (HOUGHTON, 2000). Ensaios *in vitro* são o método de escolha para monitorar o fracionamento de extratos e frações, pois a carência de facilidades apropriadas e / ou as pequenas massas de amostra disponíveis usualmente inviabilizam ensaios *in vivo* (HADACEK & GREGER, 2000).

2.2 A ora-pro-nóbis

A espécie vegetal *Pereskia aculeata*, comumente conhecida como ora-pro-nóbis, possui propriedades farmacológicas e nutricionais importantes, sendo fonte de minerais como o cálcio, ferro e fósforo trazendo um potencial para o tratamento de doenças (ALMEIDA *et al.*, 2014). É uma hortaliça não convencional que geralmente não é amplamente consumida pelas pessoas, pois geralmente o consumidor consome as mesmas hortaliças e não fornece outras opções para o seu prato, mostra ausência de toxicidade em suas folhas e é rica em nutrientes que a torna importante na alimentação humana e animal (TAKEITI, 2009).

Os estudos que avaliam sua composição química e nutricional são abundantes, ela apresenta em suas folhas teores de proteína, fibras dietéticas totais, minerais, vitaminas, carotenoides totais, entre eles o β -caroteno, licopeno, ácido oxálico, nitrato, saponinas,

compostos fenólicos e um inibidor da tripsina (GONÇALVES *et al.*, 2015). As folhas e frutos da ora-pro-nóbis são comestíveis, apresentando valores elevados de flavonoides e carotenoides, com alto poder antioxidante associado à redução de doenças crônicas degenerativas como câncer e doenças cardiovasculares (QUEIROZ, 2012). Foram relatadas, na literatura, atividades anti-inflamatória e antianêmica, devido à rica composição em proteínas, sendo que se pode empregar a planta como auxiliar dos sistemas digestivo e imunológico, entre outros (ALMEIDA *et al.* 2014; BRASIL, 2010; QUEIROZ, 2012; TAKEITI *et al.*, 2009).

3 METODOLOGIA

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa de campo, de natureza descritiva e do tipo quantitativo quanto à sua abordagem. Foi elaborado através pesquisa sistemática em artigos científicos constantes nas bases de dados do Google Acadêmico, Pubmed e Scientific Electronic Library Online (*SciElo*). Foram incluídos, na pesquisa, artigos publicados no período de 1999 a 2020, nas línguas portuguesa e inglesa, de conteúdo relacionado ao tema de pesquisa, encontrados através da pesquisa com os seguintes descritores: ora-pro-nóbis, *Pereskia aculeata*, plantas medicinais, bioprospecção, prospecção fitoquímica, atividade antifúngica, biodiversidade brasileira, cerrado brasileiro.

A parte prática foi desenvolvida nos meses de abril e maio de 2021. Os ensaios relativos aos processos de obtenção dos extratos vegetais e à prospecção fitoquímica dos metabólitos secundários descritos como majoritários na planta em estudo foi realizada pela discente, sob supervisão da sua orientadora, nos laboratórios de Química da Faculdade Ciências da Vida. A avaliação *in vitro* da atividade antifúngica dos extratos etanólico e aquoso da espécie ora-pro-nóbis foi realizada pelo Professor Msc. João Carlos Maia Dornelas de Oliveira, no laboratório de Micologia do Departamento de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG).

3.1 Coleta e secagem do material vegetal

As folhas (100 g) do ora-pro-nóbis, *Pereskia aculeata*, foram coletadas na horta da Faculdade Ciências da Vida (Espaço Plantare), Sete Lagoas, em março de 2021, e procedeu-se com a sua identificação pelas características das suas folhas e flores. Uma exsicata foi preparada, se necessárias futuras identificações botânicas. As folhas foram higienizadas e selecionadas quanto ao princípio de integridade física e cor e secas à temperatura ambiente,

intercalando sombra e sol, durante 20 dias (OLIVEIRA, AKISUE & AKISUE, 2014). Para os ensaios, utilizou-se o material vegetal previamente macerado em gral de vidro.

3.2 Ensaio de pureza

Para certificar a pureza do material vegetal, foram realizados os testes de umidade e cinzas totais nas folhas secas e maceradas, em triplicata. Para o teste de determinação da umidade empregou-se a perda por dessecação pelo método gravimétrico, em que se utiliza o aquecimento de 2 g da amostra em estufa a 105°C por 2 horas, dessecação e posterior cálculo do teor de umidade, de acordo com a metodologia descrita na Farmacopeia Brasileira 6. ed. (BRASIL, 2019) e em SIMÕES *et al.*, 2017. Para a determinação do teor de cinzas totais, utilizou-se a incineração a 550°C de 2g da amostra em forno mufla por 1 hora, dessecação e, em seguida, foram feitos os cálculos de teor de cinzas (SIMÕES *et al.*, 2017; SIMÕES *et al.*, 2010; BRASIL, 2019).

3.3 Bioprospecção fitoquímica

3.3.1 Bioprospecção fitoquímica de flavonoides

Aqueceu-se, em chapa aquecedora, até a fervura, por cerca de 3 minutos, 2 g da droga vegetal folhas rasuradas de ora-pro-nóbis com 20 mL de etanol. Esfriou-se e filtrou-se em papel de filtro, separando o filtrado em dois tubos de ensaio e uma cápsula de porcelana.

No primeiro tubo de ensaio realizou-se a reação da cianidina (COSTA, 2002), juntando, ao extrato, 1 mL de HCl concentrado e 2 mg de zinco metálico e observando-se a coloração formada. No segundo tubo de ensaio adicionou-se 1 gota de solução aquosa de cloreto férrico (FeCl₃) a 4,5% e observou-se a formação de complexo de coloração escura (SIMÕES *et al.* 2017). Ao filtrado da cápsula de porcelana, adicionaram-se cerca de 8 gotas de solução etanólica de AlCl₃ a 5%. Aqueceu-se em banho-maria até pequeno volume e visualizou-se sob lâmpada UV, em comprimento de onda de 254 nm (COSTA, 2002).

3.3.2 Bioprospecção fitoquímica de taninos

Aqueceu-se até fervura, por cerca de 3 minutos, 2g da droga vegetal com 20 mL de água deionizada, resfriou-se e filtrou-se em papel filtro, separando-se o filtrado em 2 tubos de ensaio. No primeiro tubo de ensaio, foram adicionadas de 2 gotas da solução aquosa de FeCl₃ a 4,5%, observando-se a coloração formada. No segundo tubo, adicionaram-se 5 mL da

solução aquosa de gelatina a 2,5% contendo 10% cloreto de sódio (NaCl) e observou-se a alteração de consistência no meio reacional (MATOS, 1999; COSTA, 2002).

3.3.3 Bioprospecção fitoquímica de saponinas

A presença de saponinas foi investigada através do ensaio qualitativo para determinação do índice de espuma (SIMÕES, 2010; COSTA, 2002; BRASIL, 2019). Pesouse, em um béquer, 1 g das folhas rasuradas de ora-pro-nóbis, adicionaram-se 10 mL de água deionizada e levou-se à decocção por 30 minutos. Transferiu-se para tubos de ensaio (triplicata) e agitou-se 30 segundos, deixando em repouso por 15 minutos, quando marcou-se a altura da espuma com caneta. A reação é positiva se é observada espuma persistente de pelo menos 1 cm e negativa no caso de desaparecimento da espuma.

3.4 Obtenção dos extratos vegetais para a avaliação de atividade antifúngica *in vitro*

Os extratos aquoso e etanólico da hortaliça ora-pro-nóbis foram preparados sob aquecimento em chapa aquecedora a 60°C, por 10 minutos, solubilizando-se 10 g das folhas da planta trituradas em água destilada e álcool etílico a 70%, respectivamente, perfazendo uma concentração de 10% para ambos extratos (BRASIL, 2019). Os extratos foram filtrados em papel de filtro e armazenados em frascos de vidro âmbar hermeticamente fechados.

3.4.1 Avaliação da Concentração Inibitória Mínima (CIM)

A susceptibilidade das linhagens de *Candida* sp. e *Cryptococcus* sp. foi realizada segundo o documento M27-A3 do método de microdiluição em caldo proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) para determinação da concentração inibitória mínima (CIM) (CLSI, 2017). Os antifúngicos e preparo das soluções estoque foram determinadas as CIMs para o antifúngico fluconazol (FCZ; Sigma-Aldrich). Solução estoque foi preparada na concentração de 5000 µg/mL e o FCZ foi solubilizado em água destilada estéril (CLSI, 2017). A solução estoque foi, posteriormente, diluída em meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) para atingir as concentrações estabelecidas para o ensaio de determinação da CIM.

3.4.2 Diluição dos extratos vegetais

Inicialmente, foram obtidas soluções na concentração de 10% de extrato aquoso e extrato alcóolico de *Pereskia aculeata* (ora-pro-nóbis) (CSLI, 2017). Posteriormente, na diluição dos extratos vegetais, foi utilizado o meio RPMI 1640 como diluente. Diluições

seriadas foram realizadas de forma que, ao final, fossem obtidas concentrações dos dois extratos que variassem de 10% (v/v) a 0,019% (v/v).

3.4.3 Preparo das placas

Os testes de susceptibilidade foram realizados em placas de microdiluição de 96 poços de fundo chato. Foram testadas concentrações do antifúngico que variou entre 256,00 a 0,50 $\mu\text{g/mL}$ para FCZ e de 10% (v/v) a 0,019% (v/v) para os extratos vegetais. Em seguida, alíquotas de 100 μL de cada concentração foram distribuídas nos poços da placa de microdiluição.

3.4.4 Preparo dos inóculos

Amostras de *Candida albicans*, *Cryptococcus gatti* (R265) e *Cryptococcus neoformans* (28957 e H99) foram previamente cultivadas por 48 horas a 35 °C. Após este período, colônias fúngicas foram suspensas solução salina estéril e o inóculo fúngico foi ajustado para a concentração de 1×10^6 a 5×10^6 células/mL em espectrofotômetro. Diluições de 1:50 seguida de diluições de 1:20 do inóculo inicial em RPMI 1640 foram realizadas, de maneira a atingir uma concentração final de 1×10^3 células/mL (CLSI, 2017). A distribuição dos inóculos estabeleceu a seguinte disposição: uma coluna foi reservada para a inoculação de um controle de crescimento (CC) (RPMI + inóculo) e outra coluna para o controle de esterilidade (RPMI) (**Figura 1**). Nas demais colunas foram adicionadas as suspensões dos inóculos com a solução do composto e extratos vegetais associados ao RPMI 1640.

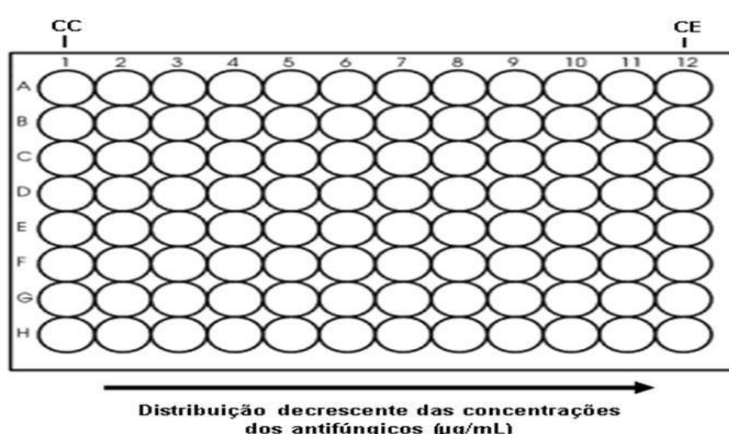


Figura 1. Esquema de um teste de concentração inibitória mínima dos compostos antifúngicos e extratos vegetais em placa de microdiluição de 96 poços. A numeração de 2 a 11 indicam as concentrações, que podem variar de acordo com o agente antifúngico e extratos vegetais. Os números 1 e 12 representam, respectivamente, o controle de crescimento (CC) e o controle de esterilidade (CE).

Alíquotas de 100µL do inóculo foram distribuídas em cada poço da placa de microdiluição (CLSI, 2017). Por fim, as placas foram incubadas a 35 °C por 72 horas para posterior leitura e análise. O ensaio foi realizado em duplicata técnica.

3.4.5 Leitura e interpretação da concentração inibitória mínima (CIM)

A leitura da CIM foi realizada pela observação visual, após 72 horas de incubação a 35°C, comparando o controle de crescimento da levedura com o crescimento observado nos outros poços com as diferentes concentrações de antifúngicos e extratos vegetais (CLSI, 2017). Nesse contexto, a CIM foi determinada considerando-se as menores concentrações que inibiram 80% do crescimento fúngico para FCZ e de 100 % para os extratos vegetais após o tempo de incubação (CLSI, 2017).

4 ANÁLISE DE DADOS

4.1 Ensaios de pureza

O ensaio gravimétrico para a determinação do teor de umidade, realizado através da perda por dessecação, é preconizado pela F. Bras. 6ª. edição (2019) e foi realizado para assegurar a qualidade do processo de secagem realizado. A **Tabela 1** apresenta os valores de percentual de umidade obtidos, em triplicata, para as folhas de ora-pro-nóbis, e verifica-se que o teor médio de umidade da amostra (8,11%) atende às especificações farmacopeicas que ditam que, quando não especificado de forma diferente na monografia específica da planta, o limite se encontra entre 8 e 14% (BRASIL, 2019). ALMEIDA *et al.* (2014) e TAKETI *et al.*, (2009), ao estudarem a mesma espécie vegetal, encontraram valores de umidade dentro das especificações, destacando que isso influencia na qualidade da erva, demonstrando a eliminação de fatores antinutricionais, preservando suas características físico-químicas e diminuindo seu processo oxidativo.

Tabela 1 – Teste de determinação do teor de umidade por perda por dessecação

	ENSAIO DE UMIDADE – perda por dessecação				
	Massa béquer vazio (g)	Massa Amostra (g)	Massa béquer após o ensaio (g)	Massa amostra dessecada (g)	% umidade
1	31,266g	1,398g	32,552g	1,286	8,01
2	35,900g	1,458g	37,229g	1,329	8,84
3	31,217g	1,337g	32,454g	1,237	7,48

Média 1,284 8,11

Obs. cálculo do % umidade = massa dessecada/massa inicial.100 = x; 100 – x = % umidade. **Fonte:** Autoria própria, 2021.

A **Tabela 2** apresenta os resultados da determinação do teor de cinzas totais, realizada em triplicata, de acordo com o preconizado pela F. Bras. 6. ed. (2019).

Tabela 2 – Teste de determinação do teor de cinzas totais

ENSAIO DE CINZAS TOTAIS						
	Massa vazio (g)	Massa cadinho (g)	Massa Amostra (g)	Massa cadinho após o ensaio (g)	Massa cinzas (g)	% cinzas
1	28,016g	1,044g	1,044g	28,218g	0,202	19,35
2	29,850g	1,001g	1,001g	30,030g	0,18	17,9
3	23,300g	1,026g	1,026g	23,535g	0,235	22,9
Média					0,206	20,05

Obs. cálculo da % cinzas = massa dessecada/massa inicial.100. **Fonte:** Autoria própria, 2021.

Foi obtido um valor médio de 20,05% de cinzas, fora das especificações farmacopeicas (2 a 3%), mostrando um indicativo de adulteração mineral após a queima da matéria orgânica. No entanto, no caso do ora-pro-nóbis, relata-se que as folhas possuem um resíduo mineral fixo alto (21,0%), que indica que a mesma pode ser uma fonte importante de minerais para o organismo humano, como o cálcio e o ferro, evidenciando seu valor nutricional (KINUPP & BARROS, 2008; QUEIROZ, 2012).

4.2 Bioprospecção Fitoquímica

Nas análises para identificação de compostos fenólicos (taninos e flavonoides) foi constatada, com a adição de FeCl₃, a cor azul esverdeada nas soluções extrativas (**Tabela 3**), a qual indica a presença de taninos e flavonoides, segundo RAJU *et al.* (2007) e TAKEITI *et al.* (2009). A mudança na coloração da amostra demonstra a presença dos mesmos. Com relação ao teste com a gelatina para constatar a presença de taninos (BRASIL, 2021), verificou-se uma turbidez no extrato da planta, o que confirma a presença deste metabólito nas folhas de *Pereskia aculeata*. De acordo com a literatura (SIMÕES *et al.*, 2010; BESSA *et al.*, 2013; LUZ *et al.*, 2014, BRASIL, 2021), os taninos são substâncias capazes de precipitar proteínas, como a gelatina, através de formação de interações intermoleculares do tipo ligação de hidrogênio, o que provoca a turbidez da solução.

A tradicional reação de cianidina consiste na redução dos compostos flavônicos amarelos até cianidinas, que são avermelhadas, caracterizando flavonoides em extratos

vegetais. Dependendo da sua estrutura química, cada classe de flavonoide vai apresentar uma reação própria por ação do zinco metálico em presença do HCl concentrado, que libera o gás hidrogênio (H₂), que é o agente redutor dos flavonoides. Constatando a presença de flavonoides na amostra de ora-pro-nóbis em estudo, observou-se, neste ensaio, o desenvolvimento de cor que variou do róseo ao avermelhado (**Tabela 3**). Segundo os autores Costa (2002), Vieira *et al.* (2019) e Garcia *et al.* (2019), a *Pereskia aculeata* apresenta-se positiva à reação de cianidina, mostrando flavonoides, o que corrobora os resultados encontrados.

No teste com cloreto de alumínio (AlCl₃), para identificação de flavonoides, observouse, após exposição do extrato à luz UV₂₅₄, uma fluorescência amarela-esverdeada que se intensificou à medida que foi adicionado mais AlCl₃ à amostra. Este é um ensaio clássico sugerido por HARBORNE, em 1954, para identificar a presença de certos grupamentos químicos em flavonoides a partir da complexação com este reagente (MABRY *et al.*, 1970).

No intuito de avaliar a presença de saponinas, observou-se a formação de espuma persistente e abundante nos três tubos que foram agitados e, sequencialmente, ficaram em repouso por 15 minutos, o que demonstrou a presença deste metabólito secundário no extrato vegetal. De acordo com Matos *et al.* (1997), a presença persistente de espuma de aproximadamente 1cm de altura indica que a amostra possui saponinas em sua composição.

Os resultados das pesquisas de flavonoides, taninos e saponinas nos extratos de orapro-nóbis estão sumarizados na **Tabela 3**, a seguir.

Tabela 3 – Resultados dos ensaios de bioprospecção fitoquímica

CLASSES DE METABÓLITOS PESQUISADOS	REAGENTES (ENSAIOS)				
	FeCl ₃	AlCl ₃	Reação da Cianidina (HCl + Zn metálico)	Precipitação da gelatina salgada	Índice de espuma
Flavonoides	+ (complexo azulado)	+ (fluorescência amarela)	+ (aparecimento de cor vermelha na solução)	NA	NA
Taninos	+ (complexo azulado)	NA	NA	+ (turvação)	NA
Saponinas	NA	NA	NA	NA	+ (espuma persistente nos 3 tubos)

Legenda: + = presença do metabólito na amostra; NA = Não se aplica. **Fonte:** Autoria própria, 2021.

4.3 Potencial da atividade antifúngica dos extratos vegetais de ora-pro-nóbis

O método de microdiluição em caldo proposto pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) considera a relação entre a proporção de crescimento do microrganismo desafiado no meio líquido e a concentração da substância ensaiada fornecendo resultados quantitativos.

No presente estudo, observou-se que a CIM do extrato etanólico foi reduzida em comparação aos controles (Fluconazol e etanol utilizado para obtenção do extrato etanólico) indicando que as linhagens fúngicas utilizadas no ensaio apresentam susceptibilidade a algum composto existente neste extrato vegetal, conforme apresentado na **Tabela 4**. Com relação ao extrato aquoso não foi observada ação antifúngica em nenhuma concentração testada frente aos microrganismos, o que permitiu o crescimento das células leveduriformes. Além disso, os isolados foram sensíveis ao fluconazol, como já era esperado (**Tabela 4**).

Nesse trabalho, mostrou-se que *C. albicans*, *C. gattii* e *C. neoformans* foram sensíveis a algum composto existente no extrato etanólico de ora-pro-nóbis o que deve ser mais explorado, devido o extrato etanólico obtido de folhas dessa planta conter flavonoides, taninos e saponinas. De acordo com HAGGAG *et al.* (2017), estes compostos são comumente descritos na literatura devido suas atividades biológicas já conhecidas, tais como atividade antiviral, antitumoral antifúngica e antibacteriana. Análise fitoquímica realizada por Lobo *et al.* (2013) demonstrou a presença de flavonoides em extrato etanólico do rizoma de *Typha domingensis* Pers, sendo esta substância sugerida como provável fungicida contra leveduras patogênicas, uma vez que a atividade antifúngica já foi demonstrada para diferentes flavonoides. Este dado corrobora com os resultados obtidos no presente estudo, uma vez que o extrato etanólico demonstrou atividade antifúngica e a planta produz flavonoides entre outros compostos em seu metabolismo.

A busca por novos agentes antifúngicos se mostra extremamente importante uma vez que o surgimento de linhagens fúngicas resistentes ao fluconazol tem despertado preocupação com relação a saúde humana e interesse pela busca de novas moléculas bioativas (SIONOV *et al.*, 2012) o que demonstra o potencial de *Pereskia aculeata* para prospecção e obtenção de novas moléculas com atividade antifúngica ainda desconhecidas. Segundo Lobo *et al.* (2013), o número restrito de antifúngicos atualmente disponíveis e o aumento observado na resistência dos microrganismos a estas moléculas levam a um crescente interesse busca de novas substâncias possuam diferentes mecanismos de ação em relação aos antifúngicos atualmente utilizados.

Tabela 4 – Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) para fluconazol, etanol e extratos vegetais de ora-pro-nóbis.

CONCENTRAÇÃO INIBITÓRIA MÍNIMA (CIM)				
Linagem	Extrato etanólico	Etanol	Extrato aquoso	Fluconazol
<i>C. albicans</i>	0,1	0,3	>5	64
<i>C. gatti</i> (R265)	0,03	0,06	>5	4
<i>C. neoformans</i> (28957)	0,1	0,3	>5	0,5
<i>C. neoformans</i> (H99)	0,03	0,1	>5	4

Fonte: Autoria própria, 2021.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A droga vegetal empregada neste trabalho, folhas de ora-pro-nobis, cultivadas no espaço Plantare, a horta da FCV, foi avaliada quanto à sua pureza, o que permitiu verificar que o processo de secagem foi feito de forma adequada, pois o teor de umidade esteve dentro das especificações e que a porcentagem alta de cinzas obtida pode ser devido à alta concentração de minerais presentes nesta planta alimentícia não convencional (PANC), que é bastante empregada devido ao seu alto conteúdo proteico.

Os principais metabólitos secundários bioativos relacionados para a espécie, na literatura, foram também identificados nesta pesquisa, confirmando o potencial da planta para utilização como medicinal. O extrato etanólico obtido das folhas mostrou importante atividade antifúngica *in vitro*, sendo mais ativo que a substância usada como referência no ensaio, frente a todas as cepas testadas, o que possibilita concluir que esta planta demanda estudos futuros visando aprofundar os ensaios para confirmação de sua atividade antifúngica.

Esta pesquisa apresentou, como fatores limitantes, o pequeno tempo para realização dos ensaios experimentais, devido à permissão de uso restrito dos laboratórios devido à pandemia de COVID-19, o que permitiu a caracterização apenas dos metabólitos descritos na literatura como majoritários para a espécie. Em consequência disso, os ensaios de atividade biológica foram realizados apenas com duas cepas de fungos.

Como perspectivas futuras, o trabalho apresenta a possibilidade de bioprospecção de outras classes de metabólitos presentes e doseamento dos metabólitos já identificados, realização de novos ensaios de atividade antifúngica *in vitro*, empregando cepas fúngicas diferentes e menor concentração da amostra, para estabelecer a concentração inibitória

mínima e, ainda a realização do ensaio de atividade em modelo animal, empregando camundongos.

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, M. E. F. *et al.* **Caracterização química das hortaliças não convencionais conhecidas como ora-pro-nóbis.** Biosci. J., Uberlândia, v. 30, p. 431-439, 2014.

ALMEIDA, J. R. G. S.; SILVA-FILHO, R. N.; NUNES, X. P. DIAS, C. S.; PEREIRA, F. O.; LIMA, E. O. **Antimicrobial activity of the essential oil of *Bowdichia virgilioides* Kunt.** Rev. Bras. Farmacogn., v. 16, suppl. 0, 2006.

BESSA, N. G. F. D.; BORGES, J. C. M.; BESERRA, F. P.; CARVALHO, R. H. A.; PEREIRA, M. A. B.; FAGUNDES, R.; CAMPOS, S. L.; RIBEIRO, L. U.; QUIRINO, M. S.; CHAGAS JUNIOR, A. F.; ALVES, A. **Prospecção fitoquímica preliminar de plantas nativas do cerrado de uso popular medicinal pela comunidade rural do assentamento vale verde – Tocantins.** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 15 n. 4, p. 692-707, 2013. Disponível em: doi: 10.1590/S1516-05722013000500010.

BRAGA, F. de C. **Pesquisa Fitoquímica.** In: Leite, J.P.V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas.** 1. ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

BRASIL. Conselho da Gestão do Patrimônio Genético (CGEN). Artigo nº7 Inc. VII, da MP 2.186-16/01, Brasília de 23 agosto de 2001.

BRASIL. Formulário de Fitoterápicos da Farmacopeia Brasileira. 2. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2021.

BRASIL. Farmacopeia Brasileira. 6. ed. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Brasília: Anvisa, 2019, v.1.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde.** Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. – Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. Manual de hortaliças não convencionais. Brasília: Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Corporativismo, 2010.

BRASILEIRO, M. T. *et al.* ***Ximenia americana* L.: botânica, química e farmacologia no interesse da tecnologia farmacêutica.** Revista Brasileira de Farmácia, v. 89, n. 2, p. 164-167, 2008.

CASTRO, M. R.; FIGUEIREDO, F. F. **Saberes tradicionais, biodiversidade, práticas integrativas e complementares: o uso de plantas medicinais no SUS.** Hegeia - Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde v.36, n. 2, p. 123-145, 2019.

COSTA, A. F. **Farmacognosia.** 6. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian, 2002. v.1.

ELOFF, J. N. **A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria.** *Planta Med.*, 64: 711-713, 1998.

GARCIA, J. A. A.; CORRÊA R. C. G.; BARROS L.; PEREIRA C.; ABREU, R. M. V.; ALVES M. J. **Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an under exploited super food from the Brazilian Atlantic Forest.** *Food Chem.* 2019; 294:302-8.

GONÇALVES, J. P. Z. *et al.* **Quantificação de proteínas e análise de cinzas encontradas nas folhas e caule da Ora-Pro-Nóbis (*Pereskia aculeata* Miller).** Anais do XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química. p. 1-6, 2014. Disponível em: <http://pdf.blucher.com.br.s3sa-east-1.amazonaws.com/chemicalengineeringproceedings/cobeq2014/0167-26714164573.pdf>. Acesso em: 15 de Abril de 2021.

HADACEK, F. & GREGER, H. Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. **Phytochemical Analysis**, v.11, p. 137-147, 2000.

HAGGAG, M.W. ABOU EL ELLA, S.M. ABOUZIENA H.F. **Phytochemical analysis, antifungal, antimicrobial activities and application of *Eichhornia crassipes* against some plant pathogens.** *Planta Daninha*, v. 35:e017159560, 2017.

HOUGHTON, P. J. Use of small scale bioassays in the discovery of novel drugs from natural sources. **Phytotherapy research**, v. 14, p. 419-423, 2000.

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.

KINGHORN, A. Douglas. **Pharmacognosy in the 21st century.** *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, v. 53, n. 2, p. 135-148, 2001.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. D. Teores de proteínas e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, SP, v. 857, p. 846, 2008.

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

LOBO, M. A.; TOMA, W.; SILVA, M. P. O.; YAMAMOTO, N. S.; GUIMARÃES, L. L. Avaliação da atividade antifúngica in vitro de frações semi-purificadas obtidas a partir do rizoma *Typha domingensis* Pers (Typhaceae). **BioScience**, v. 2 nº 1, p. 42 – 51, 2013.

LUZ, H. S.; SANTOS, A. C. G.; LIMA, F. C.; MACHADO, K. R. G. Prospecção fitoquímica de *Himatanthus drasticus* Plumel (Apocynaceae), da mesorregião leste maranhense. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 16, n. 3, p. 657-662, 2014. Disponível em: doi: 10.1590/1983-084x/12_114.

MABRY, T. J., MARKHAM, K. R.; THOMAS, M. B. **Systematic identification of flavonoids**. Springer-Verlag; New York, USA; 354 pp. 1970

MACIEL, M. A. M. *et al.* **Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares**. Quím. Nova, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, May 2002.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**, EUFC, Fortaleza, Brasil, 3.ed. p.234-243,1997.

MORAIS, D. V., MOREIRA, M. M., SILVA, F. L., COSTA, M. A. P. C., DELERNEMATO, C., CARVALHO, C. A. L., ESTEVINHO, M. L. M. (2019). ***Dalbergia ecastaphyllum* leaf extracts: *in vitro* inhibitory potential against enzymes related to metabolic syndrome, inflammation and neurodegenerative diseases**. Acta Scientiarum Biological Sciences, 41, e46622.

OLIVEIRA, F., AKISUE, G. AKISUE, M. K. **Farmacognosia**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2014.

OOTANI, M. A. *et al.* **Use of Essential Oils in Agriculture**. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v.4, n.2, p. 162-174, 2013.

PEREIRA, A. V.; RODRIGUES, O. G.; LOBO, K. M. S.; BEZERRA, D. A. C.; MOTA, R. A.; COUTINHO, L. C. A.; SILVA, L. B. G.; ATHAYDE, A. C. R. **Atividade antifúngica do neem e jurema-preta sobre cepas de *Candida* spp. isolados de vacas com mastite subclínica no Estado de Pernambuco**. Rev. Bras. Farmacogn., 19(4): 818-822. 2009.

QUEIROZ, C. R. A. A. **Cultivo e composição química de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* mill.) sob déficit hídrico intermitente no solo**. 2012. 144 f. Tese (Doutorado) - Curso de Agronomia (ciências do Solo), Faculdade de Ciências Agrárias e Veterinárias – Unesp, Jaboticabal, 2012.

RIBEIRO, P. dos A.; REIS, W. G. dos; ANDRADE, R. R. de; QUEIROZ, C. R. A. dos A. **Ora-pro-nóbis: cultivo e uso como alimento humano**. Em Extensão. Uberlândia, v. 13, n. 1, p. 70-81, jan. / jun. 2014.

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.

SHASANY, A. K.*et al.* **Phenotypic and RAPD diversity among *Cymbopogon winterianus* Jowitt accessions in relation to *Cymbopogon nardus* Rendle**. Genetic Resources and Crop Evolution, v. 47, n. 5, p. 553- 559, 2000.

SILVA, N. L. A. *et al.* **Triagem fitoquímica de plantas do cerrado da área de proteção ambiental municipal do Inhamum, Caxias, Maranhão**. *Scientia Plena*, v.6, n.2, p.1-17, 2010.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; MENTZ, L. A. **Farmacognosia: do produto natural ao medicamento.** São Paulo: Artmed, 2017. 502 p. ISBN: 9788582713594.

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: Editora UFRS/ UFSC. 2010. 821 p. ISBN 85-7025-537-3.

SIONOV, E. *et al.* **Identification of a *Cryptococcus neoformans* cytochrome P450 lanosterol 14 α -demethylase (Erg11) residue critical for differential susceptibility between fluconazole/voriconazole and itraconazole/posaconazole.** Antimicrob. Agents Chemother., v. 56, n. 3, p. 1162-9, 2012.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLRES-QUEIROA, F. P.; PARK, K. J. **Nutritive vegetable (*Pereskia aculeata* Mill).** International Journal of Food Sciences and Nutrition, v. 60, n. 1, p. 1-13, 2009.

VIEIRA, C. R.; DA SILVA, B. P.; DO CARMO, M. A. V; AZEVEDO, L.; NOGUEIRA, D. A.; MARTINO, H. S. D.; SILVA, R. R. **Effect of *Pereskia aculeata* Mill. *in vitro* and *in over weight humans: a randomized controlled trial.*** J. Food Biochem., v. 43, n. 7, e12903, 2019.

VENTUROSOSO, L. R. *et al.* **Atividade antifúngica de extratos vegetais sobre o desenvolvimento de fitopatógenos.** Summa Phytopathol., Botucatu , v. 37, n. 1, p. 18-23, 2011.

VICENTE, N. F. DE P. **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de *Pereskia grandifolia* Haw. Lavras:UFLA.** Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de Lavras. Programa de Pós-Graduação em Agronomia/Plantas Medicinais, Aromáticas e Condimentares. 2017. 58 p.