

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA
FACULDADE DE FARMÁCIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
MESTRADO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS

Mariana de Souza Ferreira Maciel

***Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE): uma hortaliça não convencional com potencial uso medicinal**

Juiz de Fora
2019

Mariana de Souza Ferreira Maciel

***Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE): uma hortaliça não convencional com potencial uso medicinal**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito a obtenção do grau Mestre em Ciências Farmacêuticas. Área de concentração: Produtos Naturais Bioativos.

Orientador: Prof^ª. Dra. Elita Scio Fontes

**Juiz de Fora
2019**

Mariana de Souza Ferreira Maciel

***Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE): uma hortaliça não convencional com potencial uso medicinal**

Dissertação de Mestrado submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, da Universidade Federal de Juiz de Fora - UFJF, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Aprovada em 31 de julho de 2019.

BANCA EXAMINADORA



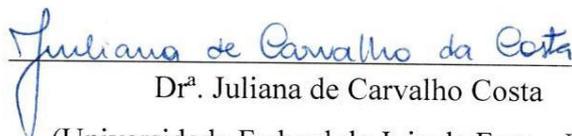
Dr^a. Elita Scio Fontes - Orientadora

(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)



Dr^a. Ana Paula do Nascimento Duque

(Faculdade do Sudeste Mineiro – FACSUM)



Dr^a. Juliana de Carvalho Costa

(Universidade Federal de Juiz de Fora – UFJF)

AGRADECIMENTOS

Agradeço, sobretudo, a Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades. Me proporcionando saúde, força e fé para realizar esse trabalho, que era um grande desejo meu.

A Universidade Federal de Juiz de Fora e a Faculdade de Farmácia pela oportunidade de crescimento profissional, e as agências de fomento, CAPES, FAPEMIG e CNPq pelo suporte financeiro.

A minha orientadora Dra. Elita Scio Fontes, por me receber, tão bem, em seu grupo de trabalho, pelo apoio, disponibilidade e motivação pela busca de novos conhecimentos.

Ao Prof. Dr. Guilherme Diniz e os colaboradores do Laboratório de Desenvolvimento de Sistemas Nanoestruturados (LDNano) da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Juiz de Fora pela a realização das atividades em cultura de células.

A Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) pelos estudos realizados em cromatografia gasosa.

A faculdade de Nutrição, ao Laboratório de Composição de Alimentos e o técnico João Pablo, por toda ajuda e disponibilidade.

A toda minha família, em especial a minha mãe Elizabete, que é meu exemplo e minha base, sem a qual eu jamais poderia ter sonhado em chegar aonde estou hoje. Ao meu filho João Gabriel, que é a luz da minha vida, quem me faz querer sempre ser uma pessoa melhor. A minha irmã Giovanna, que também é a minha melhor amiga, com quem sempre posso contar, nas horas mais felizes e nas nem tão felizes assim. A minha avó Olívia pelo apoio, torcida e orações diárias. E a todos os familiares que torcem por mim.

A todos os membros do LPNB, por estarem sempre dispostos e disponíveis ao compartilhar o conhecimento que possuem na rotina do dia a dia, e pelos momentos de descontração. Em especial à Nathalia e ao Ari que fizeram com que os dias mais complicados ficassem mais leves e descontraídos. Ao técnico Delfino pelas conversas e dedicação em colaborar com meu trabalho.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para que esse trabalho se desenvolvesse de maneira tão positiva.

Meu muito obrigada!

“A ciência nunca resolve um problema
sem criar pelo menos outros dez”.

— George Bernard Shaw

Resumo

A espécie *Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE) conhecida popularmente como Ora-pro-nobis, é considerada uma hortaliça não convencional, apresentando alto teor de mucilagem e sendo popularmente aplicada em casos de queimadura para a cicatrização e em processos inflamatórios. Existem poucos estudos sobre sua constituição fitoquímica, esses se limitando as folhas. Estudos biológicos indicam uma promissora atividade antioxidante. O presente trabalho foi dividido em dois capítulos para melhor entendimento. No primeiro, extratos de *P. aculeata* foram avaliados quanto a viabilidade celular, atividade antioxidante e antiglicante, e um estudo fitoquímico foi realizado com a partição em hexano (PHEX). Dentre as metodologias executadas foi realizada cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas (CG-MS), o doseamento de fenóis e flavonoides, bem como a atividade antioxidante que foi mensurada por diferentes metodologias. O potencial antiglicante foi avaliado pelo teste de glicação com os açúcares frutose e glicose. Para mensurar a viabilidade celular foi usado o MTT. Com relação aos resultados, 12 substâncias foram identificadas em PHEX e pode-se observar a presença de fenóis e flavonoides em maior quantidade nas amostras em diclorometano (PDCM) e em acetato de etila (PAcEt). A atividade antioxidante se mostrou promissora para as amostras, porém de maneiras diferentes entre si, pois os métodos utilizados podem detectar características variáveis. Com relação a atividade antiglicante, as amostras PHEX e PAcEt se mostraram mais eficientes frente aos açúcares utilizados, quando em maiores concentrações. As amostras não se mostraram citotóxicas frente as linhagens de células L929 e HaCaT. No segundo capítulo, duas formulações contendo PHEX (INFLATIV), nas concentrações de 6% e 12%, foram submetidas ao estudo de estabilidade acelerado seguindo legislação preconizada pelo Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Ambas formulações apresentaram pouca variação em relação ao pH e densidade, porém ao longo do estudo amostras apresentaram crescimento microbiano, não sendo possível dar continuidade. No entanto, na avaliação química de quantificação do fitol, presente no extrato e quantificado nas formulações, apenas INFLATIV 6%, armazenado em baixa temperatura, apresentou estabilidade no período de três meses.

Palavras-chave: potencial antioxidante, potencial antiglicante, estudo da estabilidade, MAPA.

ABSTRACT

The species *Pereskia aculeata* Miller (CACTACEAE) popularly known as Ora-pro-nobis, is considered an unconventional vegetable, presenting a high mucilage content and being popularly applied in cases of burn for wound healing and to treat inflammatory process. A few studies about phytochemical constitution are limited to the leaves. Biological studies indicate a promising antioxidant activity. The present work was divided in two chapters for a better understanding. In the first chapter, the cell viability, antioxidant and antiglycative activities were evaluated against *P. aculeata* extracts. The phytochemical studies were performed to the hexane partition (PHEX). Among the methodologies performed it was made a gas chromatography coupled to mass spectrometer (GC-MS). Antioxidant activity were measured by different methodologies. The antiglycative potential was evaluated by the glycation test with fructose and glucose sugars. MTT was used to measure cell viability. Regarding the results, 12 substances were identified in PHEX and the presence of phenols and flavonoids in the samples in dichloromethane (PDCM) and in ethyl acetate (PAcEt) can be observed. The antioxidant activity was promising for the samples, but in different ways among them, since these methods can detect distinct characteristics. At the higher concentrations, with both sugars used, PHEX and PAcEt were efficient in the antiglycative activity. The samples were not cytotoxic. In the second chapter, two formulations containing PHEX (INFLATIV), in the concentrations of 6% and 12%, was submitted to an accelerated stability study following legislation recommended by the Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA). Both formulations showed little variation in relation to pH and density, but throughout the study samples were microbiologically contaminated, not being possible to continue the studies. However, in the evaluation of phytol quantification, only INFLATIV 6%, stored at low temperature, showed stability in the period of three months.

Keywords: antioxidant potential; antiglycative potential; stability study; MAPA.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Esquema simplificado da formação de metabólitos especiais (secundários) envolvendo os precursores e vias biossintéticas.....	17
Figura 2	Distribuição geográfica da família Cactaceae no Brasil.....	19
Figura 3	Distribuição geográfica do gênero <i>Pereskia</i> no Brasil.....	21
Figura 4	Distribuição geográfica de <i>Pereskia aculeata</i> Miller no Brasil.....	23
Figura 5	<i>Pereskia aculeata</i> Miller.....	24
Figura 6	As principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e suas potenciais origens.....	28
Figura 7	Vias de formação e produtos finais de glicação avançada (AGE).....	31
Figura 8	Fluxograma da obtenção das amostras pela extração e particionamento.....	36
Figura 09	Cromatograma da partição hexânica obtido por meio de cromatografia com fase gasosa associada a espectrômetro de massa.	43
Figura 10	Estruturas das substâncias químicas identificadas em PHEX por CG-EM.....	45
Figura 11	Efeito do extrato e partições de <i>Pereskia aculeata</i> avaliada pelo método de Griess na inibição do radical NO•.....	50
Figura 12	Atividade antioxidante das amostras de <i>Pereskia aculeata</i> obtida pelo método β -caroteno/ácido linoleico.....	52
Figura 13	Atividade antioxidante das amostras de <i>Pereskia aculeata</i> avaliada pelo método de redução do fosfomolibdênio.....	54
Figura 14	Percentual de inibição da glicação do extrato e partições das folhas de <i>Pereskia aculeata</i> na presença da Frutose (A) e Glicose (B).....	55
Figura 15	Viabilidade celular das células queratinócitos (HaCat) frente ao extrato e partições das folhas de <i>Pereskia aculeata</i>	58
Figura 16	Viabilidade celular das células de fibroblastos (L929) frente ao extrato e partições das folhas de <i>Pereskia aculeata</i>	59
Figura 17	População de animais no Brasil.....	67
Figura 18	Faturamento do mercado pet brasileiro em 2017.....	67
Figura 19	INFLATIV 6% (A) e 12% (B) envasado em vidros transparente.....	76

Figura 20	INFLATIV nas concentrações de 6% (A) e 12% (B), após centrifugação.....	79
Figura 21	Valores do pH inicial e final de INFLATIV 6% (A), INFLATIV 12% (B) e base controle (C).....	82
Figura 22	Valores de densidade inicial e final de INFLATIV 6% (A), INFLATIV 12% (B) e base controle (C).....	84
Figura 23	Gráfico da regressão linear do INFLATIV, expresso em fitol, com concentrações variando de 1,5% a 12%.....	85

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Composição nutricional das folhas de <i>Pereskia aculeata</i> (g/100 g)....	24
Tabela 2	Composição de aminoácidos encontrados nas folhas de <i>Pereskia aculeata</i>	25
Tabela 3	Massa e rendimento do extrato e partição de <i>Pereskia aculeata</i>	42
Tabela 4	Constituintes químicos identificados na partição hexânica por cromatografia com fase gasosa associada a espectrômetro de massa..	44
Tabela 5	Teor de fenóis.....	47
Tabela 6	Atividade antioxidante do extrato e partições de <i>Pereskia aculeata</i> utilizando o radical livre DPPH.....	49
Tabela 8	Condições para Estudo de Estabilidade Acelerada (EEACe).....	71
Tabela 9	Condições para teste de Estudo de Estabilidade de Longa Duração (EELD).....	72
Tabela 10	Parâmetros avaliados na formulação.....	73
Tabela 11	Constituição da formulação farmacêutica de uso tópico utilizada para incorporar partição hexânica 6% e 12%.....	75
Tabela 12	Parâmetros a serem avaliados da característica organoléptica da formulação	77
Tabela 13	Valores de pH para INFLATIV 6% nas diferentes situações de estresse.....	81
Tabela 14	Valores de pH para INFLATIV 12% nas diferentes situações de estresse.....	81
Tabela 15	Valores de pH para base controle nas diferentes situações de estresse	81
Tabela 16	Valores de densidade relativa para INFLATIV 6% nas diferentes situações de estresse (g/cm ³).....	83
Tabela 17	Valores de densidade relativa para INFLATIV 12% nas diferentes situações de estresse (g/cm ³).....	83
Tabela 18	Valores de densidade relativa para base controle nas diferentes situações de estresse (g/cm ³).....	84
Tabela 19	Valores de equivalentes de fitol nas amostras após estudo da estabilidade de 90 dias.....	85

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES ANTIOXIDANTE E ANTIGLICANTE DE <i>Pereskia aculeata</i> Miller.....	13
1	INTRODUÇÃO.....	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	METABÓLITOS SECUNDÁRIOS.....	16
2.2	A FAMÍLIA CACTACEAE.....	18
2.3	O GÊNERO <i>Pereskia</i>	20
2.4	A ESPÉCIE <i>Pereskia aculeata</i> Miller.....	23
2.5	ESPÉCIES REATIVAS.....	26
2.6	PRODUTO GLICAÇÃO AVANÇADA (AGE).....	29
2.6.1	Vias alternativas formadoras de AGEs não derivadas da via clássica	31
2.6.2	Receptores para AGEs.....	32
3	OBJETIVOS.....	34
3.1	OBJETIVO GERAL.....	34
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	34
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	35
4.1	MATERIAL VEGETAL.....	35
4.2	PREPARO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO E PARTIÇÕES....	35
4.3	ANÁLISES CROMATOGRÁFICAS.....	36
4.4	DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS.....	37
4.5	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	37
4.5.1	Sequestro do radical DPPH.....	37
4.5.2	Inibição do radical óxido nítrico (NO•)	37
4.5.3	Descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	38
4.5.4	Modelo de redução do complexo fosfomolibdênio.....	39
4.6	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIGLICANTE.....	39
4.7	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	40
4.7.1	Cultura de células.....	40
4.7.2	Ensaio de viabilidade celular.....	41

4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	42
5.1	RENDIMENTO DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES.....	42
5.2	CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA.....	42
5.2.1	Análises cromatográficas.....	42
5.2.2	Teor de fenóis.....	47
5.3	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE.....	48
5.3.1	Ensaio com DPPH.....	49
5.3.2	Inibição do radical NO•.....	50
5.3.3	Descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico.....	51
5.3.4	Modelo de formação do complexo fosfomolibdênio.....	53
5.4	AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DA ATIVIDADE ANTIGLICANTE.....	55
5.5	AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR.....	57
6	CONCLUSÃO.....	61

**CAPÍTULO 2 ESTUDO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÃO TÓPICA
INFLATIV CONTENDO *Pereskia aculeata* Miller.....** 62

1	INTRODUÇÃO.....	63
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	65
2.1	PELE E OS PRODUTOS NATURAIS.....	65
2.2	INDÚSTRIA VETERINÁRIA.....	66
2.3	ESTUDO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA.....	68
3	OBJETIVOS.....	74
3.1	OBJETIVO GERAL.....	74
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	74
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	75
4.1	PREPARO DE FORMULAÇÃO INFLATIV.....	75
4.2	ESTUDO DA ESTABILIDADE.....	75
4.2.1	Teste de estresse físico.....	76
4.2.2	Características organolépticas.....	76
4.2.3	Análise do potencial hidrogeniônico (pH).....	77
4.2.4	Densidade relativa.....	77

4.2.5	Análise do perfil químico de INFLATIV por CG-EM.....	78
4.3	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	78
5	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	79
5.1	CENTRIFUGAÇÃO.....	79
5.2	CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS.....	79
5.3	CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS.....	80
5.3.1	pH.....	80
5.3.2	Densidade.....	83
5.3.3	Perfil químico de INFLATIV por CG-EM.....	85
6	CONCLUSÃO.....	87
	APÊNDICE I.....	88
	APÊNDICE II.....	90
	REFERENCIAS.....	91

CAPÍTULO 1

CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA E ATIVIDADES
ANTIOXIDANTE E ANTIGLICANTE DE *Pereskia aculeata* Miller

1 INTRODUÇÃO

O uso de plantas medicinais é relatado desde os tempos mais remotos na prevenção e no tratamento de doenças físicas e mentais. Hoje essa prática é também empregada como recurso na medicina alternativa em todo mundo, sendo conhecida como medicina complementar ou étnica (CARNEIRO et al., 2014; YUAN et al., 2016).

Segundo a legislação vigente, planta medicinal é toda espécie vegetal, cultivada ou não, utilizada com propósitos terapêuticos (BRASIL, 2014). Com base nesse princípio, novos estudos vêm sendo realizados com o intuito de avaliar o verdadeiro efeito das plantas medicinais na promoção da saúde ou prevenção de fatores de risco para diversas doenças crônicas, como diabetes, doenças cardiovasculares, dislipidemias, hipertensão, síndrome metabólica, entre outras (YUAN et al., 2016).

Dentro do contexto de doenças e distúrbios crônicos, estudos relacionados ao estresse oxidativo vem sendo realizados pois, à longo prazo, a produção excessiva de espécies reativas pode sobrecarregar o sistema de defesas antioxidantes do organismo promovendo peroxidação lipídica, danos ao DNA e proteínas e, conseqüentemente levar a lesão e morte celular (ASADI et al., 2011).

Relacionada à indução do estresse oxidativo, podemos incluir o processo de glicação, que favorece a geração de radicais livres, alterações morfofuncionais e aumento da expressão de mediadores inflamatórios (ASADI et al., 2011; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008). A glicação é uma reação não enzimática que ocorre por meio da ligação entre açúcares redutores, como frutose e glicose, e proteínas, lipídios ou ácidos nucleicos, produzindo os produtos de glicação avançada (AGEs, do inglês *Advanced Glycation End-Products*). O acúmulo de AGE está relacionado com o dano oxidativo nos tecidos, exercendo função importante no processo natural do envelhecimento e contribuindo para o aparecimento ou agravamento de diversas doenças crônicas desenvolvidas a longo prazo como diabetes, aterosclerose, artrite, osteoporose, doença de Alzheimer e o envelhecimento cutâneo (ASADI et al., 2011; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; TORRES et al., 2018).

No intuito de avaliar extratos vegetais e derivados, o grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNB) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, desenvolve pesquisas relacionadas à busca de novas moléculas bioativas e à elaboração de produtos finais acabados.

Neste contexto, dada a importância dos efeitos fisiológicos e patológicos decorrentes do estresse oxidativo e do acúmulo de AGES, este trabalho traz uma abordagem avaliativa do potencial antioxidante e antiglicante da espécie *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae), com o biomonitoramento de suas partições, bem como o estudo da viabilidade celular, afim de contribuir com o conhecimento sobre o uso seguro dessa espécie.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

No passado, os metabólitos especiais ou secundários (MS) eram erroneamente referidos como compostos sem função na manutenção dos processos vitais das plantas. Hoje se sabe que são importantes compostos envolvidos no desenvolvimento, crescimento e defesa, regulando a interação entre a planta e o meio ambiente. A produção desses metabólitos está relacionada com o estresse que a planta sofre em seu habitat, como alternância de temperatura, umidade, intensidade luminosa, fornecimento de água, minerais, CO₂ e ataque de herbívoros e patógenos (GANDHI; MAHAJAN; BEDI, 2015; GKOGKOLOU; BÖHM, 2012; NCUBE; VAN STADEN, 2015; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

A síntese dos MS acontece a partir dos produtos do metabolismo primário mediante conversões enzimáticas e mecanismos sistemáticos altamente organizados. A glicose originária da fotossíntese dará origem à acetil coenzima A (acetil-CoA) e ao ácido chiquímico, que através de reações e vias específicas dão origem aos mais diversos metabólitos especiais, como os terpenos, compostos fenólicos (ligninas, flavonoides, cumarinas e taninos) e aos compostos nitrogenados (alcaloides e glicosídeos cianogênicos) (Figura 1), reforçando a ideia da existência de redes coordenadas na interface dos dois metabolismos (GANDHI; MAHAJAN; BEDI, 2015; NCUBE; VAN STADEN, 2015; RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011).

Todas as plantas produzem MS, contudo essa produção é restrita e relacionada a grupos específicos de plantas taxonomicamente relacionadas, contribuindo para os odores, sabores e cores específicos das plantas. Porém, a produção destes compostos é frequentemente baixa (menos de 1% em peso seco) e dependente da fase fisiológica e de desenvolvimento da planta (RAMAKRISHNA; RAVISHANKAR, 2011; WINK et al., 2010).

2.2 A FAMÍLIA CACTACEAE

A Família Cactaceae faz parte das Angiospermas e compreende 128 gêneros e 1450 espécies de distribuição quase exclusiva do continente americano, com algumas espécies do gênero *Rhipsalis* que se encontram no continente africano. Está dividida em quatro subfamílias (Pereskioideae, Opuntioideae, Cactoideae e Maihuenioideae) sendo que apenas as três primeiras ocorrem no Brasil (BRAVO FILHO et al., 2018; FLORA DO BRASIL 2020, 2018).

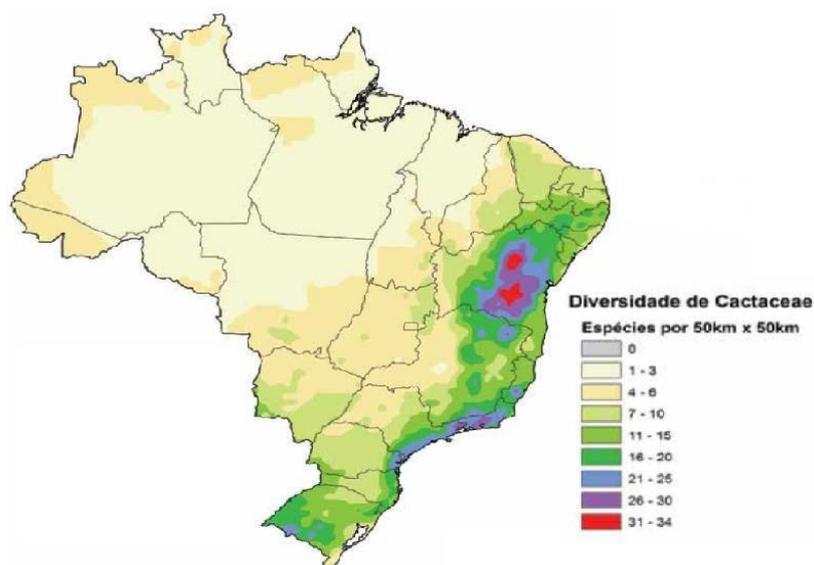
Dentro das quatro subfamílias conhecidas há outra divisão quanto ao gêneros, em que a maior das subfamílias é a Cactoideae com 7 tribos, subdividas em gêneros: *Cactaeae*, *Cereaeae*, *Echinocereaeae*, *Hylocereaeae*, *Notocactaeae*, *Rhipsalideae* e *Trichocereaeae*; em segundo lugar encontramos a Opuntioideae com 2 tribos, *Opuntieaeae* e *Cylindropuntieae*; já as subfamílias Pereskioideae e Maihuenioideae tem um gênero representando cada (BÁRCENASA; YESSONB; HAWKINS, 2011).

No território brasileiro são reconhecidos 39 gêneros e 261 espécies, dos quais 14 gêneros e 188 espécies são endêmicas, com grande porcentagem de espécies ameaçadas de extinção (BRAVO FILHO et al., 2018; FLORA DO BRASIL 2020, 2018). Os gêneros reconhecidos como os maiores são *Rhipsalis*, *Pilosocereus* e *Melocactus* (LIMA, 2012).

Com distribuição em todo território nacional, podendo ser encontradas em uma vasta diversidade de clima, solo e ecossistemas, as Cactaceas apresentam domínio fitogeográfico nas regiões da Amazônia, Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Figura 2)(BRAVO FILHO et al., 2018; FLORA DO BRASIL 2020, 2018). O Brasil abriga o terceiro centro de diversidade das cactáceas, sendo o México e sul dos Estados Unidos o mais significativo e a região dos Andes que inclui a Bolívia, Argentina e o Peru ficando em segundo lugar (CARNEIRO et al., 2016).

Estudos mostram que no estado do Rio de Janeiro são encontradas 45 espécies pertencentes a 13 gêneros, sendo *Rhipsalis* o gênero mais representativo (MORAES et al., 2005), já no estado de Sergipe foram identificados o uso de 11 espécies referente a 5 gêneros distintos, sendo mais citado o gênero *Melocactus* (BRAVO FILHO et al., 2018). No estado da Paraíba há registro de identificação de 6 gêneros e 13 espécies nativas (LIMA, 2012). No estado do Rio Grande do Sul foram identificados 11 gêneros e 65 espécies (CARNEIRO et al., 2016).

Figura 2 - Distribuição geográfica da família Cactaceae no Brasil



Fonte: Plano de ação Nacional para conservação das Cactáceas, Silva et al (2011)

Dentre as características marcantes dessa família está a grande diversidade de hábitos, sendo atribuídas variadas formas desde pequenos arbustos até grandes árvores. As cactáceas são em geral plantas perenes, xerofíticas e suculentas, adaptadas às regiões semiáridas, com hábitos diversos. O caule é suculento e fotossintetizante, com morfologia variada. Possuem aréolas de onde emergem flores, espinhos, folhas, frutos e novos ramos. Quando presentes as folhas são suculentas, alternadas, laminares, cilíndricas, podendo ser decíduas ou ausentes. Com flores vistosas e em sua maioria solitárias. Frutos suculentos, globosos a turbinados, polpa que pode apresentar colorido vistoso, com sementes numerosas (FREITAS, 1990; LIMA, 2012; MORAES et al., 2005; FLORA DO BRASIL 2020, 2018).

A família Cactaceae apresenta importante valor socioeconômico e usos tradicionais importantes em todo mundo, uma vez que pode ser utilizada na alimentação, na medicina popular, como forragem para animais e em cerimônias religiosas. De forma indireta, algumas espécies de *Opuntia* abrigam um inseto, o *Dactylopius coccus*, que produz o ácido carmínico utilizado como corante natural para tingir tecidos, cosméticos, tintas e alimentos, tendo valor econômico-industrial muito valioso. Flores de *Disocactus flagelliformis*, em infusão, são utilizadas no México no controle de infecções cardíacas. No Nordeste podem ser utilizadas na produção artesanal de cachimbos, na fabricação de portas, janelas, caibros e ripas e como enchimento para almofadas e cangalhas. Em regiões diversas no mundo as espécies *Hylocereus spp.*, *Pereskia aculeata*, *P. guamacho sp.*, *Selenicereus setaceus* e *Stenocereus spp.*, entre outras, são muito consumidas na

alimentação humana. A exploração do comércio ornamental acontece principalmente na Europa, Ásia e América do Norte, pois algumas espécies apresentam belas flores, sendo cultivadas e colecionadas para ornamentação de residências, praças e jardins (ARIAS; VÉLIZ-PÉREZ, 2006; BRAVO FILHO et al., 2018; LIMA, 2012; MORAES et al., 2005)

2.3 O GÊNERO *Pereskia*

É o único gênero pertencente a subfamília Pereskioideae, possuindo 17 espécies já descritas (LEUENBERGER, 2008) das quais 9 são encontradas no Brasil (*Pereskia aculeata* Mill., *Pereskia aureiflora* Ritter, *Pereskia bahiensis* Gürke, *Pereskia bleo* (Kunth) DC., *Pereskia grandifolia* Haw, *Pereskia nemorosa* Rojas Acosta, *Pereskia sacharosa* Griseb., *Pereskia stenantha* Ritter, *Pereskia violacea* (LEUENBERGER, 2008; ZAPPI; TAYLOR, 2018). É um gênero de distribuição neotropical, está representado por várias espécies endêmicas do Brasil, além de outras com distribuição limítrofe (*P. nemorosa*, *P. sacharosa*). Além destas, *P. bleo*, uma espécie originária do Caribe é cultivada no Nordeste do Brasil (ZAPPI; TAYLOR, 2018).

Com distribuição geográfica no Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Rio Grande do Norte, Sergipe), Centro-Oeste (Goiás, Mato Grosso do Sul, Mato Grosso), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina), apresentam domínios fitogeográficos nas regiões da Caatinga, Cerrado, Mata Atlântica, Pampa e Pantanal (Figura 3)(ZAPPI; TAYLOR, 2018). Espécies de *Pereskia* estão distribuídas por dois terços do norte da América do Sul até a Mesoamérica e o Caribe. São cultivadas em muitos países tropicais e subtropicais, com origem na região entre o Brasil e o México, América do Sul e América Central (ZAREISEDEHIZADEH; TAN; KOH, 2014). Alguns autores relatam a possibilidade do gênero e a família dos cactos terem surgido na Mesoamérica e no Caribe (BUTTERWORTH; WALLACE, 2005).

Figura 3 - Distribuição geográfica do gênero *Pereskia* no Brasil

Fonte: Flora do Brasil 2020, 2018

Relatado como um dos membros mais primitivos, os membros do gênero *Pereskia*, não se parecem muito com outros tipos de cactos por causa de folhas substanciais e hastes finas. Podem ser árvores e arbustos que variam de 2 a 10 m de altura, com folhas largas e bem desenvolvidas, por vezes suculentas, com caules bem desenvolvidos. Numerosos segmentos florais terminais solitários ou proliferando a partir do receptáculo umas das outras, dispostos em cimeiras. Fruto solitário ou formando agregados, globoso ou turbinado, polpa translúcida ou opaca. Apresenta poucas sementes. Apesar da padronização do gênero *Pereskia* ser muito útil para identificação das plantas, ela também subestima as potenciais diferenças entre o gênero, fazendo com que uma perspectiva alternativa que ressalte a diversidade ecológica, morfológica e anatômica que é encontrada em *Pereskia* seja fundamental (BUTTERWORTH; WALLACE, 2005; EDWARDS; NYFFELER; DONOGHUE, 2005; FARAGO et al., 2004).

P. bleo é um arbusto espinhoso que pode atingir de 2 a 8 m, possui flores vermelho alaranjadas que se abrem no fim da tarde e duram apenas um dia. Suas folhas são usadas popularmente para dor gástrica, dor de cabeça, pressão alta, hemorroidas e dermatite atópica. Popularmente uma pasta é preparada para o alívio de dor em feridas ou cortes. Estudos sugerem que a planta possa ter atividades antitumoral, anti-ulcerativa, anti-reumática, propriedades anti-inflamatórias, antimicrobianas, antiparasitárias, antinociceptivas e neutralizante de venenos (ABDUL-WAHAB et al., 2012; SIM; SRI NURESTRI; NORHANOM, 2010; ZAREISEDEHIZADEH; TAN; KOH, 2014).

Dentre os fitoconstituintes relatados em *P. bleo* encontram-se alcaloides, ácidos graxos, glicosídeos, lactonas, compostos fenólicos, esteróis, terpenóides e

carotenoides, sendo relatados 20 nas folhas e dois no fruto. O fitol é o principal isolado das folhas e o de maior concentração (ZAREISEDEHIZADEH; TAN; KOH, 2014). Já foram relatados β -sitosterol, 2,4-di-tert-butilfenol, α -tocoferol, fitol, dihidroactinidiolideo, campesterol, estigmasterol, 3,4-dimethoxe- β -fenetilamina, mescalina, 3-methoxitiramina, vitexina, tiramina, catequina, epicatequina, quercetina, miricetina, β -caroteno-3,3'-diol e luteína (BEHNAZ HASSANBAGLOU, 2012; DOETSCH; CASSADY; MCLAUGHLIN, 1980; GUILHON et al., 2015; MALEK et al., 2009; ZAREISEDEHIZADEH; TAN; KOH, 2014). Abdul-Wahab et al. (2012) relataram pela primeira vez o isolamento de C-glucosilflavonoide, vitexina e o glicosídeo de β -sitosterol nos extratos de acetato de etila e diclorometano e o β -sitosterol no extrato hexânico.

Segundo estudo realizado por Abdewahab et al., (2009) quanto aos componentes minerais encontrados em *P. bleo* foi identificado que ela é rica em potássio (10,16%), o que justifica o seu uso popular na hipertensão, corroborando com estudos que relatam que uma dieta rica em potássio pode ter um papel importante na redução da pressão arterial (ZAREISEDEHIZADEH; TAN; KOH, 2014).

A *P. grandifolia* é considerada vegetativamente semelhante à *P. bleo*, o que pode gerar confusão, porém *P. grandifolia* apresenta folhas mais grossas e não-onduladas, com espinhos mais longos e menores, e flores rosa – arroxeadas, quando comparada a *P. bleo* (SIM et al., 2010). Na Malásia apresentam uso popular para tratamento de câncer, pressão alta, diabetes e doenças associadas a reumatismo e inflamação (KAZAMA et al., 2012; SRI NURESTRI; SIM; NORHANOM, 2009). No Brasil é usada para tratamentos dos distúrbios renais, por reduzir inchaço, e como emoliente, por possuir folhas suculentas com conteúdo mucilaginoso. É também de consumo na culinária regional brasileira, devido ao grande teor de proteínas, fibras, ferro, cálcio, entre outros minerais, sendo considerada um importante suplemento nutricional (KAZAMA et al., 2012).

Entre os fitoconstituintes relatados em *P. grandifolia*, Sri Nurestri et al. (2009) descrevem o β -sitosterol, α -tocoferol, fitona, 2,4-di-terc-butilfenol e uma mistura de 2,4-di-terc-butilfenol, palmitato de metila, oleato de metila e estearato de metila, encontrados na fração de acetato de etila do extrato metanólico. Outros constituintes encontrados foram duas saponinas de ácido oleanólico e três alcaloides, p-metoxi-b-hidroxi-b-fenetilamina, 3-metoxi- tiramina e tiramina (KAZAMA et al., 2012).

Em estudos *in vivo* realizados por Kazama et al. (2012) o extrato etanólico de *P. grandifolia* demonstrou atividade diurética por efeito aquarético, reduzindo

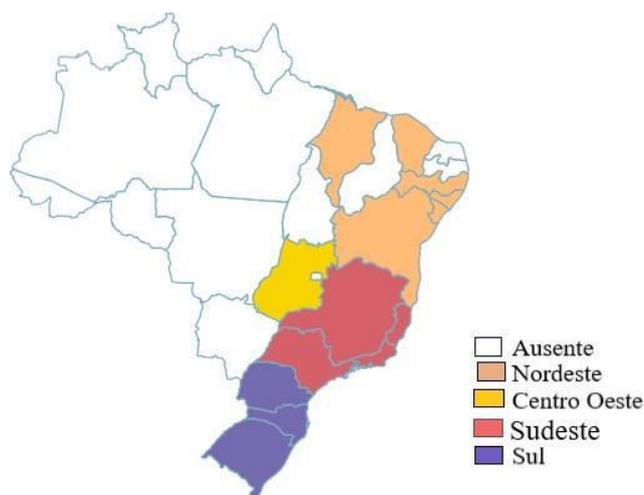
significativamente os níveis séricos de vasopressina e a pressão arterial média em ratos normotensos, sem sinal de toxicidade. O que corrobora com o uso tradicional dessa espécie.

P. sacharosa encontrada no centro oeste brasileiro, é um arbusto que pode atingir de 2 a 8 m de altura e possui folhas elípticas e flores lilás. Na Bolívia as folhas e os frutos são empregados no uso popular para tratar doenças de pele e dor de ouvido, e os espinhos para dores musculares (HAJDU; HOHMANN, 2012; PINTO; SCIO, 2014; QUIROGA; MENESES; BUSSMANN, 2012). Em estudo realizado por Uyub et al. (2010) foi demonstrada atividade antimicrobiana contra *Helicobacter pylori* com extrato de éter de petróleo das folhas de *P. sacharosa*, corroborando com o uso popular dessa espécie na Malásia.

2.4 A ESPÉCIE *Pereskia aculeata* Miller

Conhecida como Azedinha, Cipó-Santo, Espinho-de-Santo-Antônio e Ora-pro-nobis a *P. aculeata* Miller tem distribuição geográfica confirmada no Brasil nas regiões Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Sergipe), Centro - Oeste (Goiás), Sudeste (Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo) e Sul (Paraná, Rio Grande do Sul, Santa Catarina). Com domínios fitogeográficos na Caatinga, Cerrado e Mata Atlântica (Flora do Brasil 2020, 2018).

Figura 4 - Distribuição geográfica de *Pereskia aculeata* Miller no Brasil



Fonte: Flora do Brasil 2020, 2018

É um membro primitivo das Cactaceae apresentando aréolas com poucos espinhos curtos, pareados e curvos no caule, podendo atingir 10 m de altura. Suas folhas apresentam ápices agudos e formato elíptico ou oval. Tem flores em cimeiras, ou solitárias e periantos brancos. O seu fruto é produzido entre junho e julho, e apresenta formato globoso com 1 a 5 sementes de coloração amarelada, lembrando groselhas (AGOSTINI-COSTA et al., 2012; DUARTE; HAYASHI, 2005; PEREIRA et al., 2007; FLORA DO BRASIL 2020, 2018).

Figura 5 - *Pereskia aculeata* Miller



Fonte: Elaborado pelo autor

P. aculeata é considerada uma hortaliça não convencional, pois não faz parte do hábito alimentar diário das pessoas, sendo mais consumida por tradição regional ou onde há população humilde, pois suas folhas são ricas em mucilagem e proteínas, sendo conhecida como “carne de pobre” (ALMEIDA et al., 2014; PINTO et al., 2015a). Podendo ser consumidas como saladas, farinhas, ensopados, pães e massas.

Diversos estudos relatam seu valor nutricional, além dos aminoácidos encontrados nas suas folhas frescas e secas, conforme mostrado nas Tabelas 1 e 2.

Tabela 1 - Composição nutricional das folhas de *Pereskia aculeata* (g/100 g).

Composição	Almeida et al. (2014) ^b	Oliveira et al. (2013) ^b	Takeiti et al. (2009) ^a
Proteínas	28,99 g	NA	28,4 g
Lipídios	5,07 g	NA	4,1 g
Fibras solúveis	2,4 g	NA	5,2 g
Fibras insolúveis	19,17 g	NA	33,9 g

Composição	Almeida et al. (2014) ^b	Oliveira et al. (2013) ^b	Takeiti et al. (2009) ^a
Cálcio	1,35 g	2,16 g	0,0034 g
Magnésio	0,587 g	0,68 g	0,0019 g
Potássio	3,91 g	3,74 g	0,0016 g
Fósforo	0,32 g	0,45 g	0,156 g
Zinco	NA	0,0059 g	NA
Ferro	NA	0,0094 g	NA
Cobre	NA	0,0009 g	NA

Fonte: o autor. Legendas: NA: não avaliado; ^a100 g de folhas frescas; ^b100 g folhas secas.

Tabela 2 - Composição de aminoácidos encontrados nas folhas de *Pereskia aculeata*

Aminoácido	g/100 g folha seca
Triptofano	5,52 g ± 0,19
Leucina	2,0 g ± 0,02
Arginina	1,44 g ± 0,02
Lisina	1,43 g ± 0,05
Ácido glutâmico	2,67 g ± 0,03
Ácido aspártico	1,71 g ± 0,22
Alanina	1,36 g ± 0,01
Glicina	1,31 g ± 0,01

Fonte: Takeiti et al. (2009)

Devido ao seu alto teor de mucilagem, as folhas de *P. aculeata* são usadas como emoliente na medicina popular, sendo aplicadas em casos de queimadura para a cicatrização da pele e no abrandamento de processos inflamatórios, e seus frutos são empregados como expectorantes e antissifilíticos (BARROS et al., 2010; DUARTE; HAYASHI, 2005; ROSA; SOUZA, 2003; SARTOR et al., 2010).

Em estudos realizados por nosso grupo de pesquisa com as folhas de *P. aculeata*, é sugerido efeito antinocepcivo, para a partição hidrometanólica e efeito anti-inflamatório tópico e cicatrizante de feridas, para formulações contendo a partição hexânica do extrato metanólico (PINTO et al., 2015a, 2015b, 2016).

Um estudo realizado por Agostini-Costa et al. (2012) avaliou pela primeira vez o perfil de carotenoides presentes no fruto de *P. aculeata*, relatando que o principal carotenoide encontrado foi o trans-β-caroteno (34,3 μg.g⁻¹), depois o α-caroteno (22,7

$\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), luteína ($6,5 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$), e outros carotenoides minoritários. O fruto mostrou ser uma significativa fonte de provitamina A (α e β -caroteno), fornecendo mais de 100% da necessidade diária para adultos. Porém, há poucos estudos sobre os componentes fitoquímicos de *P. aculeata*, e a maioria foca na caracterização química das folhas (AGOSTINI-COSTA et al., 2012; BARROS et al., 2010).

Souza (2014) investigou o perfil fenólico das folhas de *P. aculeata* de três localidades diferentes, encontrando o ácido clorogênico, ácido caféico, ácido p-cumárico, ácido ferúlico e o kaempferol através de uma otimização multivariada da extração e uso de padrões, variando as concentrações entre diferentes amostras.

Pinto et al. (2012) identificaram por cromatografia em camada delgada, como parte da composição química presente nas folhas de *P. aculeata* fenóis, taninos condensados, taninos hidrolisáveis, cumarinas, antraquinonas, antronas, flavonoides, alcaloides, esteroides e saponinas, em um extrato metanólico e suas frações. Em outro estudo realizado pelo mesmo autor foram identificados na partição hidrometanólica, do extrato metanólico, alcaloides da classe feniletilamina, como hordenina e mescalina, além de triptamina, abrina, isômeros de di-tert-butilfenol, petunidina e quercetina, sugerindo a presença de compostos indol. Na partição hexânica, utilizando cromatografia gasosa acoplada à espectrômetro de massa (CG-MS), foi sugerido a presença de fitoesteróis, incluindo campesterol (8,97%), estigmasterol (6,89%) e sitosterol (24,66%), além de fitol (4,51%), e os triterpenos taraxasterol (11,59%) e taraxerol (7,12%), sugerindo uma atividade anti-inflamatória (PINTO et al., 2015a, 2015b).

Um estudo realizado com o óleo essencial das folhas de *P. aculeata* realizado por Souza et al. (2016) identificou 24 compostos, correspondendo a 91,03% do total do óleo. Os principais constituintes encontrados foram os sesquiterpenos oxigenados (44,92%), sendo o acorona (30,0%) o de maior concentração, seguido por (Z, Z)-metil-4,6-hexadecadieno (16,34%), 1-nonadecen-ol (6,18%) e (5E, 9E)-farnesil acetona (5,70%), e outros compostos minoritários foram relatados.

2.5 ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E NITROGÊNIO

Radicais livres são estruturas químicas com grupos de átomos ou moléculas que possuem elétrons desemparelhados em sua camada orbital externa, podem ser eletricamente neutros, terem carga positiva ou negativa, implicando em alta instabilidade energética e cinética, elevada reatividade e alta capacidade em combinar-se com diversas

moléculas integrantes da estrutura celular. Para manter sua estabilidade é necessário que doem ou recebam um elétron de outra molécula, possuindo uma vida média curta (BIRBEN et al., 2012; SINGH et al., 2012; VASCONCELOS; et al., 2014).

Porém, radical livre não é a melhor designação que se pode aplicar, pois mesmo sofrendo oxirredução nem todos os agentes possuem elétrons desemparelhados, sendo as denominações espécies reativas de oxigênio (EROS) e espécies reativas de nitrogênio (ERNS) as mais adequadas por descreverem melhor o átomo cujo elétron desemparelhado está centrado. As EROs podem ser classificadas em dois grupos -as radicalares: hidroxila ($\text{HO}\cdot$), superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$), peroxila ($\text{ROO}\cdot$) e alcoxila ($\text{RO}\cdot$); e as não-radicalares: oxigênio (O_2), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e ácido hipocloroso (HClO). Dentre as ERN estão o óxido nítrico ($\text{NO}\cdot$), óxido nitroso (N_2O_3), ácido nitroso (HNO_2), nitritos (NO_2^-), nitratos (NO_3^-) e peroxinitritos (ONOO^-). Todos podem gerar espécies danosas, porém uns são pouco reativos, enquanto outros altamente reativos causando peroxidação lipídica e danos às proteínas e ao DNA (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; HIRATA; SATO; SANTOS, 2004; VASCONCELOS; et al., 2014).

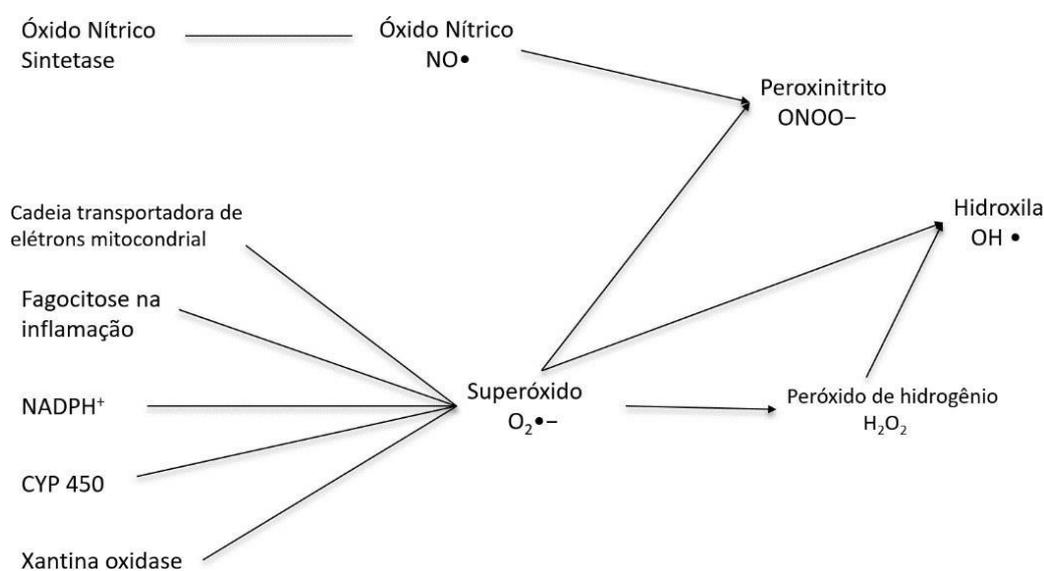
Entretanto, as espécies reativas (ER) apresentam papéis fisiológicos importantes para o organismo como controle da pressão sanguínea, sinalização celular, apoptose e fagocitose de agentes patogênicos, auxiliando macrófagos e neutrófilos. O desequilíbrio na sua produção causa o estresse oxidativo envolvido nos processos de envelhecimento, transformação e morte celular, e em patologias como câncer, Alzheimer, cardiopatias, doenças pulmonares, Parkinson, doenças autoimunes, entre outras doenças crônicas (TESTON; NARDINO; PIVATO, 2010; VASCONCELOS et al., 2007).

A produção das ER pode ocorrer de maneira endógena ou exógena. De maneira endógena, as oxidações químicas e enzimáticas são as responsáveis pela formação desses agentes, uma vez que são produzidos em condições normais pelo organismo em processos fisiológicos como produção de energia, regulação do crescimento celular, fagocitose, sinalização intracelular, defesa celular e síntese de substâncias importantes, tais como hormônios e enzimas. De maneira exógena, as principais fontes desses agentes são a radiação, tabagismo, má alimentação, estresse e uso de medicamentos (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; SIES, 2018).

O ânion superóxido ($\text{O}_2\cdot^-$) é a espécie reativa mais comumente encontrada endogenamente, sendo a mitocôndria sua principal fonte. Acredita-se que durante a respiração celular há uma ineficiência de 1 a 2% de transferência de elétrons na cadeia respiratória, o que gera o superóxido. Essa ineficiência pode aumentar em condições de

hiperóxia, quando há aumento da glicose, e em condições de hipóxia, quando o oxigênio está reduzido e não tem disponibilidade para atuar como o aceptor de elétrons, fazendo com que eles se acumulem (BURTON; JAUNIAUX, 2011; HIRATA; SATO; SANTOS, 2004). No entanto, há outras fontes endógenas de geração do $O_2^{\bullet-}$ como a fagocitose durante o processo inflamatório, ativação do metabolismo do ácido araquidônico, citocromo P450 e enzimas oxido-redutase, como a xantina (Figura 6) (BURTON; JAUNIAUX, 2011; SIES, 2018; TESTON; NARDINO; PIVATO, 2010).

Figura 6 - As principais espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e suas potenciais origens



Fonte: adaptado de Burton; Jauniaux (2011)

O estresse oxidativo é formado quando há um desequilíbrio entre o sistema pró-oxidante e antioxidante, sendo produzido no primeiro grande quantidade de espécies reativas com baixa disponibilidade de antioxidante endógeno para neutralizar as reações, causando uma cadeia de reações como alterações em proteínas extracelulares e modificações celulares, podendo em última instância levar à morte celular (HIRATA; SATO; SANTOS, 2004; VASCONCELOS; et al., 2014; VASCONCELOS et al., 2007). Esse desequilíbrio pró-oxidante-antioxidante pode ocorrer devido à alta produção de EROs ou ineficiência dos antioxidantes endógenos, sendo classificados de acordo com a intensidade com que ocorrem em estresse oxidativo fisiológico (*eustress*), e carga oxidativa tóxica que danifica biomoléculas (*distress*). No primeiro caso, as células são expostas a uma baixa concentração de EROs utilizados para sinalização redox e adaptações homeostáticas, enquanto no segundo caso, uma alta exposição aos EROs leva

a danos em alvos inespecíficos e/ou interrupção da sinalização redox. Porém, essa barreira entre alterações fisiológicas e patológicas é indistinta (BURTON; JAUNIAUX, 2011; SIES, 2018).

O estresse oxidativo pode causar danos às macromoléculas do organismo, tais como agressões às proteínas dos tecidos e das membranas, peroxidação dos lipídios de membrana (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; PEREIRA; CARDOSO, 2012). O que pode ter papel de agravamento em patologias como catarata, câncer, artrite, processos inflamatórios, disfunções cognitivas, choque hemorrágico, aterosclerose, doenças degenerativas, podendo ser fator agravante do quadro geral e influenciando a qualidade de vida (BARREIROS; DAVID; DAVID, 2006; VASCONCELOS; et al., 2014).

Como mecanismo de defesa, o organismo possui um sistema antioxidante que limita os níveis intracelulares de espécies reativas inibindo ou reduzindo os danos causados nas células. Esse sistema pode ser classificado quanto à origem e localização, em antioxidantes endógenos e exógenos, intra e extracelulares, respectivamente (VASCONCELOS; et al., 2014; ZIMMERMANN; KIRSTEN, 2008). Os antioxidantes endógenos, aqueles produzidos pelo organismo, podem ainda ser divididos em enzimáticos e não enzimáticos. Os primeiros incluem as enzimas superóxidos dismutases citoplasmática e mitocondrial, catalase, glutathione peroxidase, glutathione reductase; os segundos incluem a glutathione, ácido lipoico, albumina, ubiquinona, metalotioneínas, transferrina, ceruloplasmina. Os exógenos como o ácido ascórbico (vitamina C), tocoferol (vitamina E), carotenoides, compostos fenólicos, zinco, cobre, selênio e magnésio podem ser adquiridos na dieta alimentar (PEREIRA; CARDOSO, 2012).

2.6 AGE – PRODUTO GLICAÇÃO AVANÇADA

Os produtos de glicação avançada, chamados AGEs, são compostos altamente reativos formados pela ligação covalente e irreversível entre açúcares redutores (glicose, frutose) ou seus produtos de degradação, com proteínas extracelulares que passaram por processos oxidativos e não-oxidativos. Podem ter formação endógena em condições biológicas por meio de diferentes mecanismos e a partir de precursores heterogêneos ou podem ser introduzidos no organismo pela dieta, fumo ou poluição do ar. O estresse oxidativo está relacionado, em alguns casos, à formação de AGEs (BARBOSA et al., 2016; BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008).

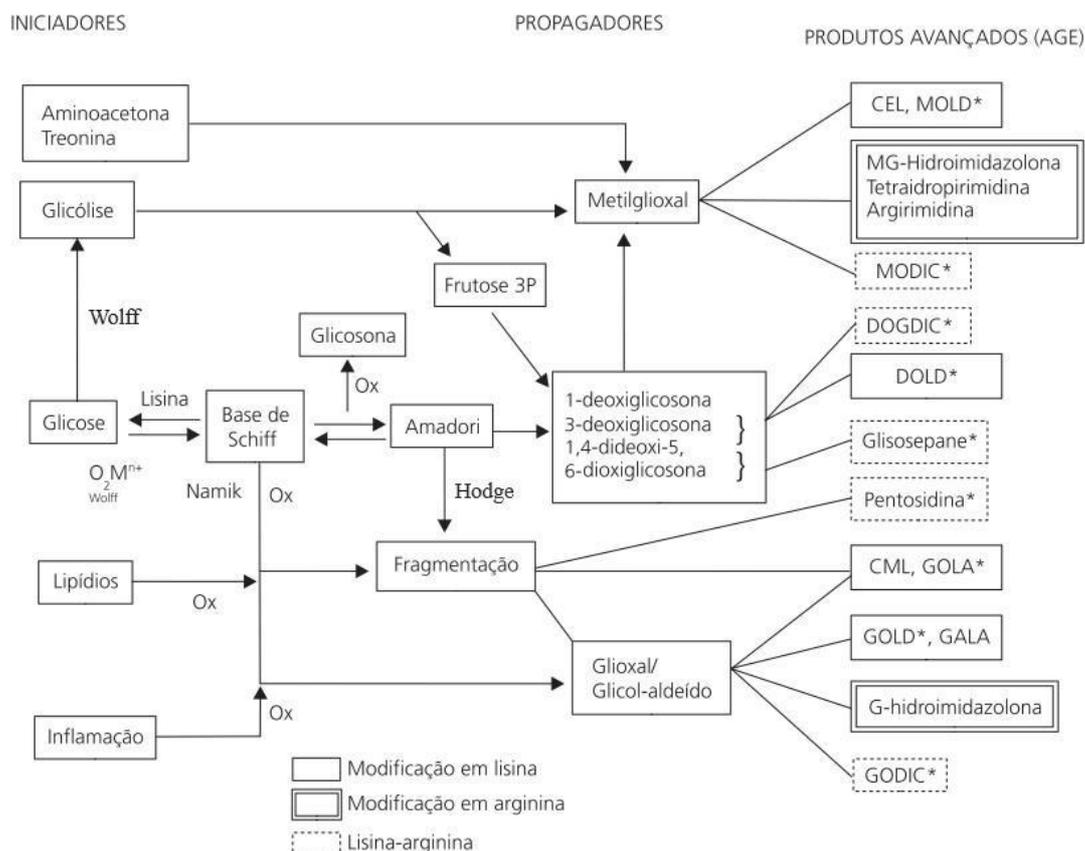
O processo de formação dos AGEs ocorre por meio da glicação, também chamada reação de Maillard (MELO, 2015), que é um processo não enzimático que ocorre quando há ligação dos grupos primários ou secundários de proteínas, aos açúcares redutores, produtos da oxidação de lipídios, aminoácidos ou do ácido ascórbico. Pode-se separar a glicação em três etapas. Na primeira etapa um grupo amina da proteína se liga à um grupo aldeído ou cetona do açúcar fisiológico (glicose, ribose e/ou frutose), formando uma carbinolamina intermediária, que sofre desidratação e produz um aduto de imina instável, também conhecido como base de Schiff, variando de horas a dias esse processo. Na segunda etapa, a base de Schiff sofre um rearranjo por meio de catálise ácido-base e forma os produtos de Amadori, que são compostos mais estáveis e reversíveis, sendo os mais conhecidos a hemoglobina glicada e frutosamina. Esse processo ocorre durante dias a semanas. Na terceira etapa, na qual ocorre a formação dos AGEs, os produtos de Amadori podem sofrer enolização, seguida por desidratação e hidrólise, formando compostos α -dicarbonílicos ou α -oxaldeídos intermediários reativos, como 3-deoxiglicosona (3DG), glioxal (GO) e metilglioxal (MG), que vão interagir com aminoácidos, como lisina, arginina e cisteína, e por meio de reações como desidratação, oxidação, fragmentação e condensação formam produtos com ligações cruzadas, levando de semanas a anos para acontecer (GIMENIS, 2015; RAHBAR et al., 2000; TORRES et al., 2018). As bases de Schiff e os produtos de Amadori são formados por reações reversíveis, porém quando há ligação com os aminoácidos, essas reações se tornam irreversíveis (GKOGKOLOU; BÖHM, 2012).

Algumas vias alternativas derivadas da via clássica (reação de Maillard) são descritas para a formação dos AGEs (Figura 7). A via na qual ocorre a auto-oxidação ou a degradação oxidativa dos produtos de Amadori é conhecida como via de Hodge. Nela, compostos carbonila podem ser formados por reações de degradação oxidativa dos produtos de Amadori interagindo assim com grupos amino livres e formar produto de glicação intermediária. Na via de Namiki ocorre a clivagem de compostos de dicarbonila da base de Schiff. A terceira via estabelecida é a via de Wolff, em que a auto-oxidação de monossacáridos, como glicose, ribose, frutose e gliceraldeído forma compostos dicarbonílicos. Todas essas vias podem levar ao desenvolvimento de AGEs quando os compostos intermediários reativos formados interagem com aminoácidos (KUMAR PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016; OTT et al., 2014).

Dentre os AGEs formados que já foram claramente estudados e identificados, sendo derivados principalmente dos compostos dicarbonílicos GO, MG e 3DG estão a

carboximetil-hidroxi-lisina, carboximetil-lisina (CEL), frutose-lisina, hidroimidazolonas, dímero de lisina-glioxal (GOLD) e dímero de lisina-metilglioxal (MOLD) (GKOGKOLOU; BÖHM, 2012; TORRES et al., 2018).

Figura 7 -Vias de formação e produtos finais de glicação avançada (AGE)



CML: carboximetilisina; carboxietilisina (CEL); DOGDIC: ligação cruzada imidazolina derivada de 3-deoxiglicosona; DOLD: dímero de lisina e 3-deoxiglicosona; GOLA: glioxal lisina amida; GOLD: dímero de glioxal-lisina, GALA: ácido glioxílico lisina amida; GODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de glioxal; MODIC: ligação cruzada imidazolina derivada de metil glioxal; MOLD: dímero de metilglioxal-lisina (Fonte: adaptado de Barbosa; de Oliveira; Seara, 2009).

2.6.1 Vias alternativas formadoras de AGEs não derivadas da via clássica

Os AGEs também podem ser formados por reações oxidativas distintas, pois todas as reações que conduzem à formação de compostos dicarbonílicos favorecem a formação de AGEs no organismo. Portanto, outras vias como reação de glicólise, reações de glicoxidação, lipoxidação e os processos inflamatórios podem estar envolvidos. Além das proteínas, as lipoproteínas e os ácidos nucleicos também são suscetíveis à ação de açúcares redutores (KUMAR PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016; TORRES et al., 2018).

As reações de lipoxidação também são responsáveis pela produção de compostos dicarbonílicos intermediários reativos, através dos produtos finais de lipoxidação avançada, chamados de ALE (do inglês *Advanced Lipoxidation End-products*). Os ALE são gerados por reações não enzimáticas de compostos dicarbonílicos reativos resultantes da peroxidação lipídica e metabolismo lipídico com os resíduos nucleofílicos de macromolécula. Os produtos da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados das membranas biológicas formam espécies reativas de carbonila (RCS), como malondialdeído (MDA), 4-hidroxi-trans-2-nonenal (HNE) e α -oxoaldeídos, como glioxal, metilglioxal, 3-desoxiglucosona e acroleína. Além dos rearranjos adicionais os RCS podem levar a formação de AGEs como N-carboxietil-lisina (CEL), arginina pirimidina, pentosidina, pirralina, metilglioxal, glioxal-lisina e N-carboximetil-lisina (CML) (OTT et al., 2014; TORRES et al., 2018; VISTOLI et al., 2013).

Após estimulação inflamatória, macrófagos, neutrófilos e monócitos produzem enzimas mieloperoxidase e NADPH oxidase, o que induz a formação de AGEs pela oxidação de aminoácidos, essa via é descrita como não dependente de glicose (HUEBSCHMANN et al., 2006).

Pode-se dizer que devido à variedade de mecanismos e complexidade de formação, os AGEs são considerados um grupo de compostos heterogêneo, dos quais nem todas as estruturas são conhecidas (HUEBSCHMANN et al., 2006; OTT et al., 2014).

2.6.2 Receptores para AGEs

Já são descritas duas classes de receptores para AGEs, a primeira pertence à classe dos receptores que eliminam os AGEs da circulação e podem abrandar os efeitos pró-oxidantes, realizando a desintoxicação, são os receptores AGE-R1, AGE-R2 e AGE-R3 que pertencem à superfamília das imunoglobulinas, e os da família “scavenger” classe A (SR-A) e B (SR-BI), CD-36, galectina-3 e FEEL-1 e 2. Esses receptores são regulados e expressos conforme alterações metabólicas, dependendo do tipo de célula e/ou tecido (BARBOSA et al., 2016; HUEBSCHMANN et al., 2006; OTT et al., 2014; TORRES et al., 2018).

A segunda classe é o receptor RAGE (do inglês *Receptor for Advanced Glycation End-products*), também pertence à superfamília das imunoglobulinas, é um receptor multiligante encontrado na superfície de células musculares lisas, macrófagos, células endoteliais, entre outras. Sua expressão é regulada em função de modificações

metabólicas que estão relacionadas ao envelhecimento, diabetes e hiperlipidemia. Dessa interação AGE-RAGE pode surgir o processo inflamatório, o estresse oxidativo e a formação EROs (KUMAR PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016; TORRES et al., 2018).

Por ter um tempo de formação relativamente longo e afetar proteínas de vida longa, o acúmulo de AGEs está relacionado ao envelhecimento cronológico e doenças relacionadas com esse processo. Na pele, o colágeno, fibronectina e a elastina são as proteínas mais afetadas, o que leva ao processo de apoptose dos fibroblastos, agravando o fenômeno do envelhecimento cutâneo. A CML já foi detectada na epiderme de pacientes saudáveis tendo a citoqueratina 10 (CK 10) como proteína alvo da modificação (FERNANDES et al., 2019; GKOGKOLOU; BÖHM, 2012; TORRES et al., 2018).

Nesse contexto, inibidores da formação de AGE ganham atenção como potenciais agentes terapêuticos. Diversos fármacos já existentes apresentam ação antiglicante, como a metformina, o ácido acetilsalicílico, a hidralazina e derivados de 1,3-tiazol via diferentes mecanismos (TORRES et al., 2018).

Outras substâncias foram estudadas quanto ao potencial antiglicante, como a aminoguanidina, que age neutralizando os produtos reativos de Amadori, como o glioxal, metilglioxal e 3-desoxiglicosona e prevenindo a ligação cruzada. Sua ação principal era agir na prevenção da retinopatia diabética, chegando até a fase III de estudos clínicos, porém as complicações geradas com o uso crônico como, deficiência de vitamina B6, perturbações gastrointestinais, anomalias nos testes de função hepática, sintomas gripais e vasculite rara, fizeram com que os estudos fossem interrompidos (BARBOSA; OLIVEIRA; SEARA, 2008; FARSI et al., 2008; TORRES et al., 2018).

Além das substâncias sintéticas uma variedade de compostos fenólicos, derivados de plantas também vêm demonstrando uma impressionante atividade antiglicante. Em um estudo a quercetina demonstrou ser melhor e mais potente que a aminoguanidina em todos os estágios da glicação (ASHRAF et al., 2015; FARSI et al., 2008). Diversas outras substâncias vêm sendo estudadas buscando uma potencial ação antiglicante, porém até o momento nenhuma foi efetivamente aprovada para uso em humanos.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Ampliar o conhecimento do potencial antioxidante, antiglicante, citotóxico e químico da espécie *Pereskia aculeata* Miller

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato bruto metanólico (EBM) das folhas de *P. aculeata*;
- Particionar o extrato com solventes de diferentes polaridades;
- Realizar cromatografia em camada delgada (CCD) do extrato e partições;
- Determinar o teor de fenóis e flavonoides do extrato e partições;
- Analisar o perfil químico por Cromatografia Gasosa acoplado a espectrômetro de massa (CG-MS) da partição em hexano (PHEX);
- Realizar ensaios *in vitro* com o extrato metanólico e partições de *P. aculeata* a fim de avaliar:
 - Atividade antioxidante, pelos seguintes métodos:
 - DPPH;
 - Inibição da formação do óxido nítrico;
 - Sistema de descoloramento do β caroteno/ácido linoleico;
 - Formação do complexo fosfomolibdênio;
 - Atividade antiglicante;
 - A viabilidade celular frente às linhagens fibroblasto (L929) e queratinócito (HaCaT).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL VEGETAL

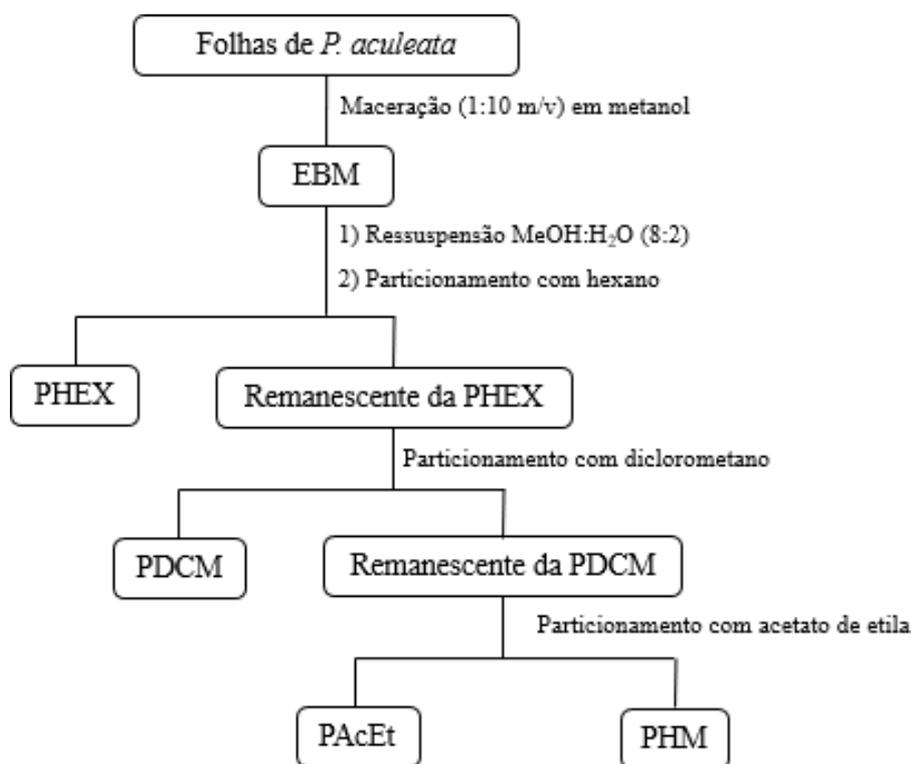
As folhas de *P. aculeata* Miller foram coletadas em Juiz de Fora no período de dezembro de 2017 a maio de 2018, no período da manhã. Uma exsicata foi depositada no herbário Leopoldo Krieger CESJF da UFJF sob o número 57539 e identificada pela Dra. Daniela Zappi (Museu Paraense Emílio Goeldi-MPEG).

4.2 PREPARO DO EXTRATO BRUTO METANÓLICO E PARTIÇÕES

Para o preparo dos extratos foi utilizada a metodologia descrita por Pinto et al (2012) com modificações, na qual as folhas coletadas foram secas à sombra, em temperatura de aproximadamente 35°C por um período de aproximadamente quinze dias. O material seco (1660 g) foi triturado utilizando moinho de facas e submetido à extração por maceração estática com metanol por um período de 48 horas. O processo foi repetido por quatro vezes. O extrato foi separado do material vegetal por meio de filtração e em seguida evaporado em evaporador rotatório a fim de concentrar a amostra e obter o extrato bruto metanólico (EBM).

Após completa remoção do solvente, 157,76 g do EBM foi ressuspendido em MeOH:H₂O (8:2) e, em seguida, particionado com solventes de polaridade crescente até o esgotamento, obtendo-se assim as partições em hexano (PHEX), em diclorometano (PDCM), em acetato de etila (PACeT) e a fração residual em metanol: água (PHM) (Figura 8). O extrato e as partições apresentaram característica higroscópica e foram armazenados hermeticamente fechados sob refrigeração.

Figura 8 - Fluxograma da obtenção das amostras pela extração e particionamento



EBM: extrato bruto metanólico; PHEX: partição em hexano; PDCM: partição em diclorometano; PAcEt: partição em acetato de etila; PHM: residual metanol:água.

4.3 ANÁLISE CROMATOGRÁFICA

PHEX foi analisada por cromatografia com fase gasosa acoplada à espectrômetro de massas (CG/EM) em aparelho GC Hewlett Packard 6890 e MS Hewlett Packard P 5972 munido de um banco de dados (WILEY 275.1). A coluna capilar utilizada foi do tipo DB-5MS com 0,25 μm de espessura do filme, 30 m de comprimento e 250 μm de diâmetro interno. O gás de arraste foi hélio com fluxo 0,5 mL/min. Para PHEX, a temperatura do injetor foi de 270°C, forno com temperatura inicial de 50°C até 300°C por 50 minutos (5 °C/min), mais 15 minutos de isoterma final a 300 °C, totalizando 65 minutos de corrida. O espectrômetro de massas operou por impacto eletrônico (70 eV), com fonte iônica a 230°C.

Os componentes individuais foram identificados pela comparação de similaridade dos espectros de massa obtidos com aqueles presentes no banco de dados da biblioteca do espectrômetro de massas (WILEY 275.1) e fontes literárias.

4.4 DETERMINAÇÃO DO CONTEÚDO DE FENÓIS TOTAIS

Para determinar o conteúdo de fenóis foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu (FOLIN; CIOCALTEAU, 1927) com modificações. As amostras foram pesadas e diluídas em metanol obtendo-se a concentração de 0,5 mg/ml. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 30 μ L de amostra, 100 μ L de solução de carbonato de sódio 4% e 120 μ L de solução do reagente de Folin-Ciocalteu 20%. Após 30 minutos ao abrigo da luz, a absorvância foi medida em 770 nm. Como branco do teste foi utilizado todos os reagentes exceto a amostra, que foi substituída por metanol. O ácido tânico foi usado como referência para o teste, sendo construída uma curva padrão em concentrações que variaram de 0,9 a 60 μ g/mL. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos em μ g/mg de amostra em equivalente a ácido tânico (EAT) \pm erro padrão. Para análise dos resultados foi usado Excel (regressão linear).

4.5 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

4.5.1 Sequestro do radical DPPH

A atividade antioxidante foi mensurada pela capacidade da amostra em sequestrar do radical DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil)(BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997). As amostras e o controle positivo (quercetina) foram pesados e solubilizados em metanol (1 mg/mL). Uma alíquota de 100 μ L da amostra foi transferida para placa de 96 poços e 10 diluições sucessivas 1:2 em metanol foram realizadas, com as concentrações variando entre 250 e 0,98 μ g/mL. Posteriormente, adicionou-se 150 μ L de uma solução de DPPH (20 μ g/mL) em metanol a esses poços. Soluções somente com amostra e metanol foram utilizados como branco do teste. A placa foi deixada em repouso ao abrigo da luz por 30 minutos e a leitura da absorvância foi realizada em 517 nm. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos na forma de IC₅₀(quantidade mínima de amostra para inibir 50%).

4.5.2 Inibição do radical óxido nítrico (NO•)

Nesse ensaio é mensurada a capacidade da amostra em inibir o radical NO•. Foi utilizado o método descrito por Green et al (1982) com modificações, através de

dosagem indireta pelo Método de Griess. Para produção do NO• foi utilizado nitroprussiato de sódio (NPS) (10 mM) em tampão fosfato (TF) (10 mM, pH 7,4). Os controles positivos, quercetina e ácido gálico, e as amostras foram solubilizadas em DMSO:tampão fosfato (1:9) e testadas na concentração de 12,5, 25, 50, 100, 200 e 400 µg/mL. Em placa de 96 poços foram adicionados 62,5 µL de nitroprussiato e 62,5 µL de controle/amostra. Foi realizado o branco da amostra onde o NPS foi substituído por tampão, e o controle negativo onde a amostra foi substituída por DMSO:tampão. A placa permaneceu à luz e temperatura ambiente por 60 minutos. Em seguida 125 µL do reagente de Griess foi adicionado, procedendo-se à leitura da absorvância após 10 minutos após, no comprimento de onda 540 nm.

Para o cálculo da porcentagem de inibição a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\% \text{ de Inibição} = \left(\frac{Ac - Aa}{Ac} \right) \times 100$$

Onde: Ac é a absorvância do controle; Aa é a absorvância da amostra.

4.5.3 Descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

Esse método, realizado segundo descrito por Marco (1968) com modificações, fundamenta-se na capacidade de peroxidação do ácido linoleico quando em contato com o oxigênio, promovendo o descoramento do β-caroteno.

Para isso uma emulsão foi preparada contendo 30 µL de ácido linoleico, 265 µL de Tween 40, 50 µL de uma solução de β-caroteno (10 mg/mL) e 500 µL de diclorometano. Essa mistura foi submetida à completa evaporação do diclorometano sob nitrogênio gasoso. Adicionaram-se 25 mL de água destilada, previamente saturada com oxigênio por 30 minutos, e agitou-se vigorosamente, com o propósito de se obter uma solução emulsionada límpida com leitura de absorvância ajustada entre 0,6 e 0,7 nm. As amostras foram pesadas, solubilizadas em metanol e avaliadas em 6 concentrações. Em microplaca de 96 poços foram adicionados 20 µL de amostra e 250 µL da emulsão. Quercetina foi utilizada como substância de referência e a emulsão como controle negativo (100% de oxidação). As leituras foram realizadas em triplicata e procederam-se de forma sequencial durante 120 minutos com intervalos de 15 minutos a 45°C em comprimento de onda de 470 nm. O decaimento da absorvância das amostras (Am) pode

ser correlacionado com o decaimento da absorvância do controle (A_c), obtendo-se a porcentagem de inibição da oxidação do β -caroteno (%I) por meio da seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Inibição} = \left(\frac{A_c - A_t}{A_c} \right) \times 100$$

Onde:

A_c é a absorvância do controle inicial (T0) – absorvância do controle final (T9); e A_a é a absorvância da amostra inicial (T0) – absorvância da amostra final (T9).

4.5.4 Modelo de redução do complexo fosfomolibdênio

Este ensaio foi realizado segundo o descrito por Prieto et al (1999) e permite determinar a capacidade antioxidante total (CAT) de uma amostra.

A solução estoque das amostras e o controle positivo (ácido ascórbico) foram preparadas em água:metanol (1:1) na concentração de 2 mg/mL. A solução reagente utilizada foi composta por 28% v/v fosfato de sódio (0,1 mol/L), 12% v/v molibdato de amônio (0,03 mol/L) e 20% v/v ácido sulfúrico (3 mol/L) em meio aquoso, com volume final ajustado para 100 ml com água destilada. Em tubos de ensaio foram colocados 2 mL da solução reagente e 300 μ L de amostra/controlado positivo. Posteriormente, os tubos foram incubados a 95 °C por 90 minutos. O branco da amostra foi feito substituindo-se a solução reagente por água destilada. Após resfriamento, uma alíquota de 200 μ L foi transferida para microplaca de 96 poços, procedendo-se a leitura a 695 nm. As leituras foram realizadas em triplicata. Uma curva de calibração foi construída com ácido ascórbico com as concentrações variando entre 1,63 e 26,08 μ g/mL. A CAT foi calculada em função da curva padrão e expressa em equivalente ao ácido ascórbico.

4.6 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIGLICANTE

A avaliação da atividade antiglicante foi realizada com base na metodologia descrita por Farsi et al (2008) com modificações. Todo o procedimento ocorreu em capela de fluxo laminar.

EBM, PHEX e PAcEt foram solubilizadas em metanol na concentração 5 mg/mL, sendo realizadas diluições seriadas nas concentrações finais de 0,05, 0,1, 0,15,

0,5, 1,0 e 1,5 mg/mL em metanol e tampão fosfato 100 mM, pH 7,4. As soluções reagentes foram preparadas e filtradas em membrana de nitrato de celulose estéril na seguinte ordem, tampão fosfato 100 mM pH 7,4, azida sódica (8 g/L), frutose (1,6 M) / glicose (1,6 M) e BSA (10 mg/mL). A cada filtração o sistema foi rinsado com tampão fosfato, trocando-se a membrana filtrante entre a solução de açúcar e BSA.

Em uma microplaca estéril de 96 poços foram aliqotados 60 µL de tampão fosfato de sódio pH 7,4, 50 µL de solução de BSA, 25 µL de solução de frutose/glicose, 50 µL da amostra e 15 µL de azida sódica. Poços contendo todos os reagentes, exceto a amostra que foi substituída por tampão fosfato de sódio, foi considerado como branco do teste. A quercetina e a aminoguanidina foram utilizadas como substância de referência. Após a primeira leitura (T0) as amostras foram incubadas ao abrigo da luz a 37°C durante 7 dias. A fluorescência foi determinada utilizando um fluorímetro, em comprimento de onda de excitação de 350 nm e em comprimento de onda de emissão de 450 nm.

Para o cálculo da porcentagem de inibição a seguinte fórmula foi utilizada:

$$\% \text{ Inibição} = 1 - \left(\frac{FT}{FC} \right) \times 100$$

Sendo 1, uma constante que representa o valor máximo de fluorescência; FT fluorescência do grupo teste; FC fluorescência do grupo controle.

4.7 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

4.7.1 Cultura de células

A linhagem de fibroblastos (L929) e de queratinócitos (HaCaT) foram cultivadas em meio *Dulbecco's modified Eagle medium* (DMEM) DMEM/Ham's F-12 (proporção 1:1), respectivamente, ambos suplementados com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) e 1% da solução dos antibióticos [penicilina (100 UI/mL) e estreptomicina (100 µg/mL)], e mantidas em estufa incubadora umidificada à 37°C e 5% CO₂ até atingirem 80% de confluência. Em seguida, o meio foi removido, as células foram lavadas com *Phosphate buffered saline* (PBS), e adicionou-se 2 mL de solução de tripsina/EDTA 2,5 e foram incubadas por 4 e 10 minutos, respectivamente, à 37°C e 5% CO₂. Para inativação da enzima tripsina acrescentou-se 4 mL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12. O meio

contendo as células foi recolhido e transferido para um tubo de centrifugação estéril de 15 mL, procedendo a centrifugação a 2000 rpm por 5 minutos. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12. Uma alíquota da suspensão foi diluída diretamente no corante Azul de Trypan 1:10 para a contagem em câmara de Neubauer.

4.7.2 Ensaio de viabilidade celular

Para a avaliação da viabilidade, as células foram transferidas para microplacas de 96 poços, com densidade celular de 5×10^3 células/poço para L929 e 1×10^4 células/poço para HaCaT, e incubadas por 24 horas em estufa incubadora umidificada à 37°C e 5% CO₂. Posteriormente, o meio foi removido e adicionou-se 90 µL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 em cada poço. Em seguida, foram adicionados 10 µL das amostras previamente diluídas em solução de DMSO:água na concentração final de 0,5% DMSO (v/v), de modo a obter-se concentrações variando entre 6,25 e 100 µg/mL (em quadruplicata). Como controles foram utilizados meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 (controle negativo) e solução de DMSO 5% (v/v) (controle positivo). As placas foram incubadas por 24 à 37°C com 5% CO₂. Após esse período, retirou-se o meio e adicionou-se 90 µL de meio DMEM ou DMEM/Ham's F-12 e 10 µL de solução de MTT à 5 µg/mL, sendo incubada por 2h 30 horas à 37 °C com 5% CO₂. Posteriormente, o precipitado formado foi dissolvido em 100 µL de DMSO e a leitura foi realizada em espectrofotômetro a 595 nm. O cálculo da porcentagem de viabilidade celular para as células tratadas com diluições das amostras foi feito a partir das médias das respectivas absorbâncias, considerando-se o valor médio da absorbância do grupo controle negativo como 100% de viabilidade.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pela análise de variância (ANOVA) two-way e comparados pelos testes de Bonferroni, os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão, os cálculos foram realizados a partir do Software estatístico GraphPad Prism 5.0.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 RENDIMENTO DOS EXTRATOS E PARTIÇÕES

A massa e os respectivos rendimentos dos processos extrativos empregados estão apresentados na tabela 3.

Tabela 3 - Massa e rendimento do extrato e partição de *Pereskia aculeata*

Extrato/Partição	Massa obtida	Rendimento
EBM	157,76 g	9,50%
PHEX	51,78 g	3,12%
PDCM	9,43 g	0,7 %
PAcEt	1,83 g	0,13%
PHM	36,65 g	2,7 %

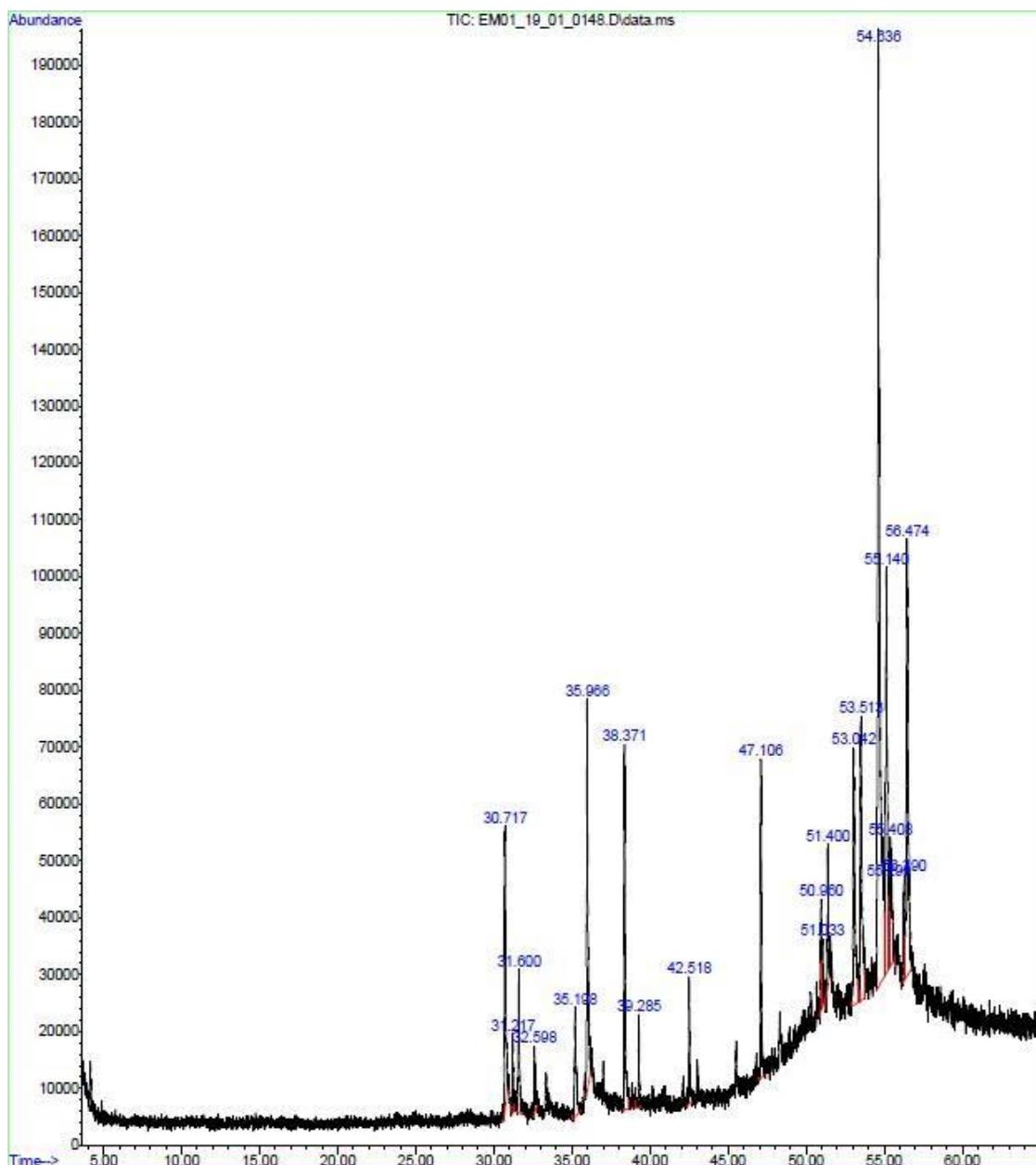
Legenda: EBM: extrato metanólico; PHEX: partição hexânica; PDCM: partição em diclorometano; PAcEt: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

5.2 CARACTERIZAÇÃO QUÍMICA

5.2.1. Análise cromatográfica

Após análise em CG-MS, foi obtido o cromatograma exibido na Figura 09. Foram encontrados 21 sinais com o tempo de retenção variando de 30,71 a 56,47, dentre os quais 12 foram identificados e descritos na Tabela 4. Os perfis de fragmentação de cada composto estão apresentados no Apêndice 1.

Figura 09 - Cromatograma da partição hexânica obtido por meio de cromatografia com fase gasosa associada a espectrômetro de massa.



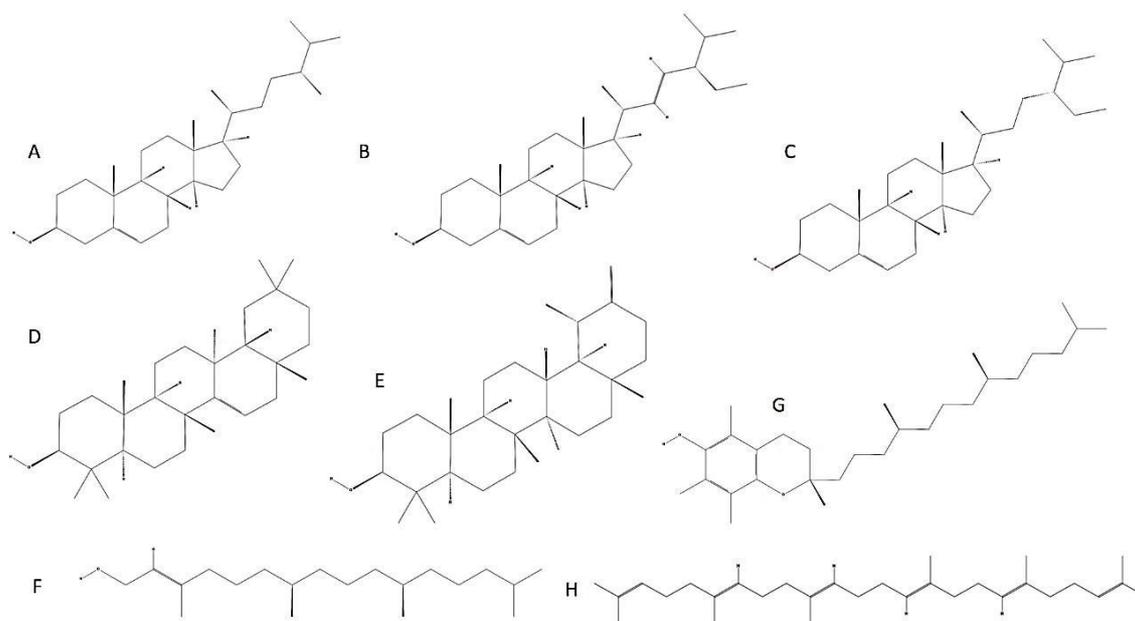
A análise foi realizada nas seguintes condições: coluna capilar de sílica fundida DB-5MS (30 m x 0.25 mm x 0.25 μ m), hélio como gás de arraste, fluxo de 0,5 mL/min, injetor com temperatura de 270°C, forno com temperatura inicial de 50 °C até 300°C por 50 minutos (5°C/min), mais 15 minutos de isoterma final a 300°C. Detecção com espectrometria de massa por ionização eletrônica a 70 eV, com temperatura da fonte de íons de 230°C.

Tabela 4 - Constituintes químicos identificados na partição hexânica por cromatografia com fase gasosa associada a espectrômetro de massa

TR (min)	Constituinte Químico	Massa Molecular	Área (%)	Principais fragmentos
30,71	Trans-pinano ^a	263	4,21	263 → 151, 137, 123, 109, 95, 82, 68, 43
31,60	Neofitadieno ^b	278	2,18	278 → 193, 149, 123, 109, 95, 81, 57, 43
32,59	Palmitato de metila ^a	270	1,10	270 → 227, 207, 181, 157, 143, 129, 100, 87, 74, 57, 44
35,96	Fitol ^a	207	6,71	207 → 140, 123, 95, 71, 43
38,37	Citrato de Acetil Tributil ^a	329	5,39	329 → 259, 213, 185, 157, 129, 112, 84, 67, 43
47,10	Esqualeno ^a	410	3,80	410 → 341, 281, 231, 207, 175, 149, 121, 95, 69, 41
51,40	Tocoferol ^a	430	1,65	430 → 386, 355, 281, 207, 165, 107, 75, 44
53,04	Campesterol ^a	476	6,43	476 → 400, 367, 341, 315, 281, 255, 231, 207, 176, 145, 105, 81, 44
53,51	Estigmasterol ^a	412	6,73	412 → 379, 351, 314, 280, 255, 231, 207, 159, 133, 105, 81, 55
54,63	Sitosterol ^a	414	27,60	414 → 381, 354, 329, 303, 281, 255, 231, 207, 173, 145, 105, 81, 43
55,14	Taraxerol ^a	426	9,22	426 → 302, 281, 269, 207, 204, 186, 135, 133, 107, 69, 44
56,47	Taraxasterol ^b	426	10,08	426 → 400, 365, 326, 281, 257, 229, 207, 189, 175, 147, 135, 121, 95, 69, 43
TOTAL			85,10	

^a Os constituintes foram identificados por comparação de seus espectros de massas com aqueles presentes nas bibliotecas Wiley 275.1; ^b Os constituintes foram identificados por comparação de seus espectros de massas com Pinto et al (2015b).

Figura 10 - Estruturas das substâncias químicas identificadas em PHEX por CG-EM



Legenda: a) campesterol; b) estigmasterol; c) sitosterol; d) taraxerol; e) taraxasterol; f) fitol; g) tocoferol; h) esqualeno

Aproximadamente 41% dos compostos identificados em PHEX por CG-MS pertencem à classe dos fitoesteróis, sendo o campesterol (6,43%), estigmasterol (6,73%) e sitosterol (27,60%) os mais abundantes. Devido à semelhança estrutural com o colesterol, os fitoesteróis vêm sendo estudados para prevenção de hipercolesterolemia e redução concentrações de LDL-colesterol, o que leva uma diminuição proporcional do risco cardíaco, e proporciona um envelhecimento saudável (ROCHA et al., 2016; SHUANG; RUI; WENFANG, 2016).

Em uma revisão realizada por Shuang; Rui; Wenfang (2016) são citados trabalhos sobre o efeito dos fitoesteróis na demência, sinalizando que o estigmasterol diminui a deficiência de memória induzida por escopolamina em camundongos, e possui efeito protetor *in vivo* contra a doença de Alzheimer, além ter diminuído significativamente os níveis de beta-amiloide (A β). Enquanto o β -sitosterol e campesterol mostraram pouco ou nenhum efeito na secreção de A β . Porém, em outro estudo realizado em indivíduos saudáveis, o β -sitosterol mostrou-se útil para a prevenção da doença de Alzheimer e inibiu efetivamente a liberação de A β induzida por colesterol alto.

Dentre as atividades relatadas para os fitoesteróis está a ação anti-inflamatória, visto que sua ingestão diminuiu os níveis plasmáticos de componentes pró-inflamatórios, incluindo proteína C-reativa, fosfolipase A₁, IL-6, TNF- α , NF- κ B e outras citocinas e fatores de transcrição (OTHMAN; MOGHADASIAN, 2011).

Fitoesteróis já foram identificados em folhas *P. aculeata*, *P. bleo* e *P. grandifolia* (MALEK et al., 2009; PINTO et al., 2015b; SHARIF et al., 2015; SRI NURESTRI; SIM; NORHANOM, 2009).

Os triterpenos como taraxerol e taraxasterol encontrados em PHEX, apresentaram atividade anti-inflamatória e antitumoral. Dentre as atividades relatadas para o taraxerol pode-se incluir ação antimicrobiana, inibição da COX, controle de glicemia, inibição da acetil colinesterase, sendo descrito com potencial para doença de Alzheimer, e atividade contra o veneno de cobra. O taraxasterol apresentou atividade anti-inflamatória, antialérgica e antioxidante (BERTÉ et al., 2018; RODRIGUES et al., 2017; SHARMA; ZAFAR, 2015). Esses triterpenos já foram identificados em *P. aculeata* por Pinto et al (2015b).

Pinto et al. (2015b) atribuíram aos fitoesteróis, ao taraxerol e taraxasterol o efeito anti-inflamatório tópico encontrado nessa espécie.

Amplamente distribuído na natureza, o fitol (6,71%) também foi encontrado em PHEX. Por possuir um aroma agradável é aplicado principalmente em cosméticos, fragrâncias finas, xampus, sabonetes e outros produtos de higiene pessoal, bem como em produtos de limpeza doméstica e detergentes. Dentre suas ações biológicas pode-se destacar a citotóxica, antioxidante, indutora de autofagia e apoptose, antinociceptiva, anti-inflamatória, imunomoduladora, antimicrobiana e antipirética, possivelmente via inibição da COX-2 (ISLAM, 2019; ISLAM et al., 2015, 2018).

O fitol já foi descrito por outros autores em *P. aculeata* (PINTO et al., 2015b; SOUZA et al., 2016) e em *P. bleo*, (MALEK et al., 2009; ZAREISEDEHIZADEH; TAN; KOH, 2014).

O tocoferol, pertencente ao grupo de vitaminas lipossolúveis, é reconhecido por seu potencial antioxidante, além de possuir propriedade neuroprotetora, anti-inflamatória e hipocolesterolêmica (LLORET et al., 2019; NIKI, 2014)

Com base no seu potencial antioxidante, o tocoferol atua neutralizando os radicais peroxila e bloqueando a peroxidação lipídica, especialmente a peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados. Isso ocorre devido à presença de um grupo hidroxila em seu grupo fenólico do anel cromanol que pode transferir átomos de hidrogênio produzindo um produto não-radical (hidroperóxido lipídico) e um radical de α -tocoferol, que pode ser regenerado de volta à sua forma nativa (LLORET et al., 2019; NIKI, 2014).

O tocoferol já foi sugerido em outras espécies do gênero *Pereskia* (BEHNAZ HASSANBAGLOU, 2012; MALEK et al., 2009; SHARIF et al., 2015; SRI NURESTRI; SIM; NORHANOM, 2009), porém a primeira vez em *P. aculeata*.

O esqualeno, um triterpeno produzido por fungos, bactérias, plantas e animais, é precursor para a biossíntese de metabólitos secundários como esteróis, hormônios ou vitaminas. Sua estrutura é formada por uma cadeia de hidrocarbonetos com seis unidades de isopreno, dando a ele caráter lipídico. Suas ligações duplas fazem com que ele seja um dos lipídios mais insaturados e sensíveis à oxidação (LOZANO-GRANDE et al., 2018; POPA et al., 2015). É considerado um triterpeno com valores nutricionais, medicinais e cosméticos, com diversas aplicações farmacêuticas. Dentre suas propriedades são sugeridas ação cardioprotetora, antioxidante, antitumoral, antibacteriano, antifúngico sendo também utilizado em suplementação alimentar (LOZANO-GRANDE et al., 2018; POPA et al., 2015).

5.2.2 Teor de fenóis

Os valores referentes ao teor de fenóis estão apresentado na Tabela 5. A equação da reta obtida para a dosagem do teor de fenóis através de regressão linear dos dados da curva foi $y = 0,0168x + 0,0226$ com coeficiente de correlação de $R^2 = 0,9992$, sendo os resultados expressos em μg de fenóis por mg de amostra equivalente a ácido tânico (EAT).

Tabela 5 - Teor de fenóis

<i>Amostra</i>	<i>EAT</i> (<i>mg de fenóis/g de amostra</i>)
EBM	$48,50 \pm 1,33$ ^{a, b}
PHEX	$58,87 \pm 0,62$ ^a
PDCM	$60,71 \pm 0,58$ ^a
PACeT	$60,55 \pm 1,82$ ^a
PHM	$39,70 \pm 1,76$ ^b

EAT: equivalente em ácido tânico; EQ: equivalente a quercetina. Média das concentrações \pm desvio padrão em ensaios realizados em triplicata para as amostras descritas. Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,05$). Legendas: EBM: extrato metanólico; PDCM: partição em diclorometano; PACeT: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

Com relação à concentração de fenóis nas amostras é possível observar que a PDCM e PACeT apresentaram maiores teores de fenóis quando comparada às outras amostras. Pinto et al (2012) por análise em CCD identificaram a presença de fenóis em

amostragem de diferentes extratos de *P. aculeata*. Em estudos realizados por Souza et al (2016) foram encontrados os valores $15,04 \pm 0,67$; $11,78 \pm 0,23$ e $5,17 \pm 0,41$ mg equivalente ácido gálico (EAG)/g de amostra, nos extrato em metanol, éter de petróleo e clorofórmio, respectivamente. O conteúdo de fenólicos foram correlacionados pelos autores à atividade antioxidante encontrada. Sousa et al (2014) verificaram a presença de fenóis nas concentrações de $50,1 \pm 0,3$, $95,6 \pm 2,9$ e $117,8 \pm 2,5$ mg EAG/g, nos extratos aquoso, etanólico 70% e em acetona 80%, respectivamente, correlacionando a maior quantidade de fenóis totais, a uma maior atividade antioxidante.

Há poucos estudos sobre o perfil fenólico dessa espécie e outras do gênero. Para *P. grandifolia* foram encontrados os valores de $38,54 \pm 0,48$; $19,08 \pm 0,43$; $45,99 \pm 0,30$ e $35,79 \pm 0,33$ mg de EAG/g para os extratos em metanol, hexano, acetato de etila e aquoso, respectivamente (SRI NURESTRI; NORHANOM; SIM, 2010). Para *P. bleo* foram descritos os valores de $27,88 \pm 0,28$; $23,15 \pm 0,35$; $40,12 \pm 0,66$ e $27,70 \pm 0,18$ mg de EAG/g para os extratos em metanol, hexano, acetato de etila e aquoso, respectivamente (SIM; SRI NURESTRI; NORHANOM, 2010).

5.3 AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE

Embora existam diversas metodologias descritas para se determinar a atividade antioxidante, é importante considerar métodos consistentes e rápidos, avaliando as vantagens e desvantagens descritas para cada um. Justifica-se assim, a necessidade de utilizar mais de um método para traçar um perfil antioxidante de uma amostra com diferentes constituintes, como extratos vegetais (KRISHNAIAH; SARBATLY; NITHYANANDAM, 2011). Para traçar esse perfil, foram utilizadas quatro diferentes metodologias que possuem como base a redução de radicais livres (método do DPPH, fosfomolibdênio, NO) e inibição do processo de peroxidação lipídica (método do β -caroteno/ácido linoleico).

Como referências foram utilizadas substâncias puras, como a quercetina, ácido ascórbico (vitamina C) e ácido gálico, de acordo com a metodologia descrita. O ácido ascórbico, utilizado no teste de formação do fosfomolibdênio, demonstrou sua atividade antioxidante por proteger os fosfolípidios da membrana do dano peroxidativo e ter uma eficiente eliminação de radicais livres. A quercetina é um flavonoide encontrado em diversas plantas, com potente ação na peroxidação lipídica e neutralização de radicais livres (PISOSCHI; POP, 2015). O ácido gálico, utilizado na metodologia do NO, está

amplamente presente no reino vegetal, podendo ser encontrado na forma livre ou como derivado e também apresenta potente atividade antioxidante (BADHANI; SHARMA; KAKKAR, 2015).

A atividade antioxidante foi avaliada pelos métodos do sequestro do radical livre DPPH, inibição da produção de NO, descolorimento do sistema β -caroteno/ácido linoleico e redução do complexo fosfomolibdênio

5.3.1 Ensaio com DPPH

Nesse método, o DPPH é capaz de sequestrar os átomos ou elétrons H^+ na presença de substâncias antioxidantes, que atuam como redutores. É possível dimensionar a atividade antioxidante pela alteração da coloração púrpura para amarela, característica da sua forma reduzida (BONDET; BRAND-WILLIAMS; BERSET, 1997; SOUZA et al., 2016).

Os valores referentes à atividade antioxidante estão na Tabela 6.

Tabela 6 -Atividade antioxidante do extrato e partições de *Pereskia aculeata* utilizando o radical livre DPPH

	QUER.	EBM	PHEX	PDCM	PAcEt	PHM
CI₅₀ ($\mu\text{g/mL}$)	1,08 \pm 0,10	3,24 \pm 1,2 ^a	8,56 \pm 0,81 ^a	3,41 \pm 0,61 ^a	3,68 \pm 0,63 ^a	53,73 \pm 3,61*

Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores estão representados como média \pm e.p.m. de CI_{50} . *Valores significativamente diferentes da quercetina ($p < 0,001$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,05$). Legenda: EBM: extrato metanólico; PHEX: partição em hexano; PDCM: partição em diclorometano; PAcEt: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

Pinto et al (2012) relataram em estudo realizado por análise bioautográfica que a maioria dos compostos antioxidantes presentes em extratos da folha, que reagem com o DPPH são fenólicos. Souza et al. (2016) encontraram para *P. aculeata* valores de IC_{50} de 7090, 18270 e 81090 $\mu\text{g/mL}$ para o extrato de metanol, éter de petróleo e clorofórmio, respectivamente. Outras espécies de *Pereskia* apresentaram resultados diversos, como no estudo de Sri Nurestri; Norhanom; Sim (2010), no qual *P. grandifolia* apresentou valores de IC_{50} 860, 285 e 140 $\mu\text{g/mL}$, para os extratos em metanol, hexano e acetato de etila, respectivamente.

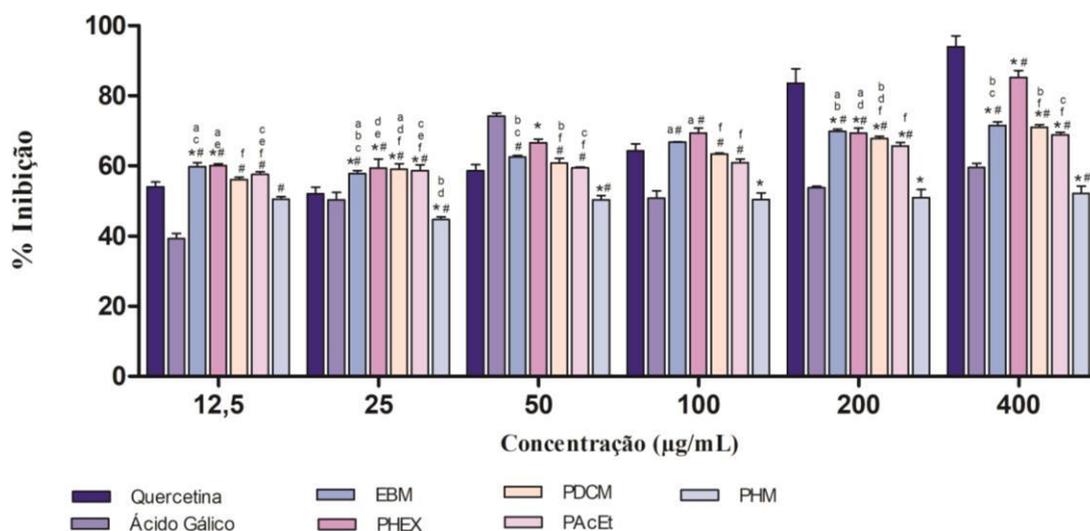
5.3.2 Inibição do radical NO•

O radical óxido nítrico (NO•) apresenta papel fundamental em diversos processos biológicos, como neurotransmissão, relaxamento muscular e regulação imune, sendo um potente vasodilatador. Porém, quando produzido de maneira exacerbada está relacionado ao estresse oxidativo, produzindo dano celular e levando a desordens patológicas (VASCONCELOS et al., 2007). Nesse sentido é interessante encontrar amostras capazes de diminuir sua produção ou sequestrá-lo.

Dentre os métodos descritos para detecção da inibição da produção do radical NO•, o mais utilizado é o método de Griess, no qual o NPS na presença de oxigênio forma nitrito que, quando em contato com sulfanilamida, sofre uma reação de diazotização, seguida pela complexação com o NED, formando um cromóforo róseo. Esse método é específico para nitrito e não detecta nitrato (GREEN et al., 1982; SINGH et al., 2012; VASCONCELOS et al., 2007).

Os resultados da inibição da produção do radical NO• das amostras estão apresentados na Figura 11.

Figura 11 - Efeito do extrato e partições de *Pereskia aculeata* avaliada pelo método de Griess na inibição do radical NO•



Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores em cada coluna representam a média \pm desvio padrão das concentrações ($\mu\text{g/ml}$). ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni foram utilizados como teste post-hoc. Valores significativos: * Valores significativamente diferentes da quercetina ($P < 0.05$); # Valores significativamente diferentes do Ácido Gálico ($p < 0,05$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,05$). Legenda: EBM: extrato metanólico; PHEX: partição em hexano; PDCM: partição em diclorometano; PACeT: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

É possível observar que, com exceção da PHM, todas as amostras inibiram 50% ou mais da produção de nitrito. E em todas as concentrações, com exceção da 50µg/mL, as amostras obtiveram resultados iguais ou superiores ao ácido gálico, e nas concentrações abaixo de 100 µg/mL apresentaram resultados iguais ou superiores à quercetina, padrões utilizados com controle positivo.

O bom resultado observado na PHEX, em todas as concentrações quando comparada a quercetina e ao ácido gálico, pode estar relacionado à presença dos triterpenos taraxerol e taraxasterol (Tabela 4) que em outros estudos demonstraram possuir propriedade de diminuir a produção de NO, PGE₂, NF-kβ, TNF-α, IL-6 e IL-1β *in vitro* (PINTO et al., 2015b; YAO et al., 2013; ZHANG; XIONG; LIU, 2012).

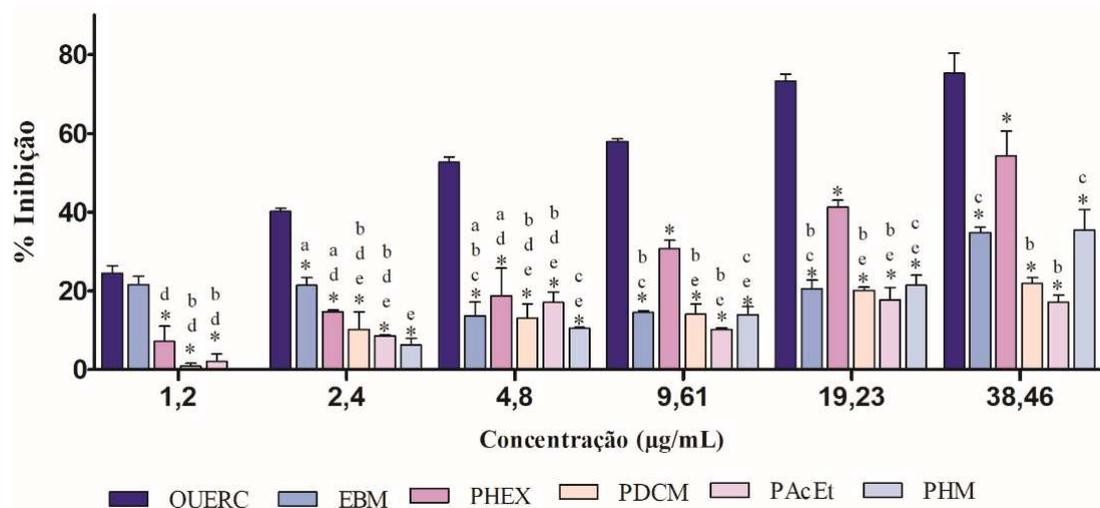
Os resultados encontrados para PDCM e PAcEt podem estar relacionados ao conteúdo de fenóis e flavonoides (Tabela 5).

5.3.3 Descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico

O método de co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico determina a atividade de uma amostra em proteger um substrato lipídico da oxidação, com base na inibição de radicais livres gerados durante a peroxidação do ácido linoleico. Nesse método, é avaliada a descoloração (oxidação) do β-caroteno frente aos produtos de degradação do ácido linoleico (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; SOUSA et al., 2014).

Na Figura 12 é possível observar os resultados da atividade antioxidante do EBM, PHEX, PDCM, PAcEt e PHM frente a metodologia de descoramento pelo sistema β-caroteno/ácido linoleico.

Figura 12 - Atividade antioxidante das amostras de *Pereskia aculeata* obtida pelo método β -caroteno/ácido linoleico.



Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores em cada coluna representam a média \pm desvio padrão das concentrações ($\mu\text{g/mL}$). Foi usado ANOVA “twoway”, seguido pelo teste de Bonferroni. Valores significativos: *Valores significativamente diferentes da quercetina ($p < 0,001$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,05$). Legenda: EBM: extrato metanólico; PHEX: partição em hexano; PDCM: partição em diclorometano; PAcEt: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

A peroxidação lipídica ocorre devido ao ataque de uma ER deixando um elétron desemparelhado no carbono, que sofre um rearranjo molecular, e ao interagir com o O_2 forma o radical peroxila. Essa reação ocorre até neutralização dos radicais formados por ação de agentes redutores, como antioxidantes lipossolúveis, que impedem a peroxidação lipídica à medida que eles doam um átomo de hidrogênio e param a reação em cadeia que causa dano lipídico na membrana (VASCONCELOS et al., 2007; YADAV; YADAV; YADAV, 2014).

Nos resultados apresentados na Figura 12 é possível observar que na menor concentração, o EBM inibiu 21,62% e não apresentou diferença estatística em relação à quercetina, que é um potente inibidor da peroxidação lipídica mesmo em baixas concentrações, variando seu percentual de inibição entre 24% - 75%. Porém, na maior concentração (38,46 $\mu\text{g/mL}$) o EBM inibiu 34%, não mostrando diferença estatística com PHM, que mostrou ter um perfil dose dependente, não apresentando atividade na menor concentração e atingindo 35% na maior.

O PHEX também mostrou um comportamento dose dependente, chegando a inibir a peroxidação lipídica em 54% na maior concentração. Essa inibição pode estar relacionada com a presença do tocoferol (Tabela 4), um potente antioxidante.

As amostras PDCM e PAcEt mostraram perfis muito parecidos na inibição da peroxidação não mostrando diferença estatística entre elas, indo de 0,8% a 21% para a primeira e de 2% a 17% para a segunda.

Souza et al. (2014) descreveram para *P. aculeata* percentuais de 75,6%, 81,2% e 63,5% para os extratos aquoso, etanólico 70% e em acetona 80%, respectivamente.

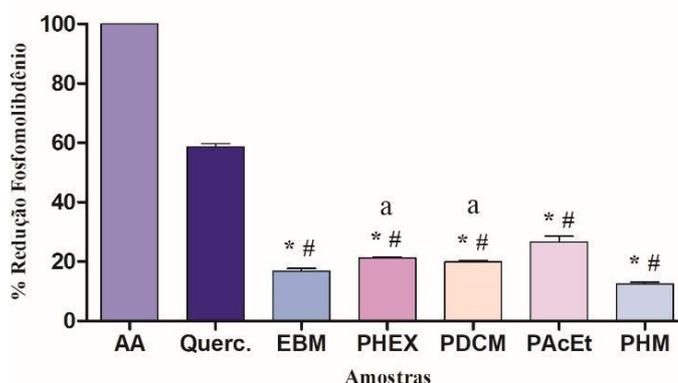
Sim; Sri Nurestri; Norhanom (2010) encontraram para *P. bleo* valores de inibição variando de 34,62 % - 72,96% para o extrato metanólico, 40,57% - 73,31% extrato em hexano, 42,21% - 83,68% extrato em acetato de etila e 27,97% - 46,17% para o extrato aquoso.

5.3.4 Modelo de formação do complexo fosfomolibdênio

Esse teste é capaz de determinar a capacidade da atividade antioxidante total de uma amostra, baseando-se na redução do molibdênio IV em molibdênio V por um agente redutor (antioxidante), e a complexação do mesmo com o fosfato em meio ácido, com formação do fosfomolibdênio V, que possui coloração verde (PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999).

Esse método apresenta como vantagem a solução da limitação referente à solubilidade da amostra, pois avalia tanto compostos lipofílicos quanto hidrofílicos em misturas complexas de maneira simples e com baixo custo (MERINO et al., 2015; PRIETO; PINEDA; AGUILAR, 1999). Os resultados do teste de formação do complexo fosfomolibdênio, que se encontram na Figura 13, estão expressos em porcentagem de redução de molibdênio em comparação a atividade do ácido ascórbico, considerada como 100%.

Figura 14 - Atividade antioxidante das amostras de *Pereskia aculeata* avaliada pelo método de formação do fosfomolibdênio



Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores estão representados como média \pm desvio padrão de EAA. ANOVA, seguido pelo teste de Bonferroni foram utilizados como teste post-hoc. *Valores significativamente diferentes da quercetina ($p < 0,05$); #Valores significativamente diferentes do Ácido Ascórbico ($p < 0,05$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,05$). AA: ácido ascórbico; Querc.: quercetina. EAA: equivalente em ácido ascórbico; EBM: extrato metanólico; PHEX: partição em hexano; PDCM: partição em diclorometano; PAcEt: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

O melhor resultado foi encontrado para PAcEt, que apresentou 21% da ação antioxidante do ácido ascórbico, o padrão referência utilizado. Apesar da baixa atividade encontrada neste modelo, o resultado é relevante, pois os extratos de *P. aculeata* são constituídos por uma mistura de substâncias e alguns constituintes podem não possuir atividade antioxidante.

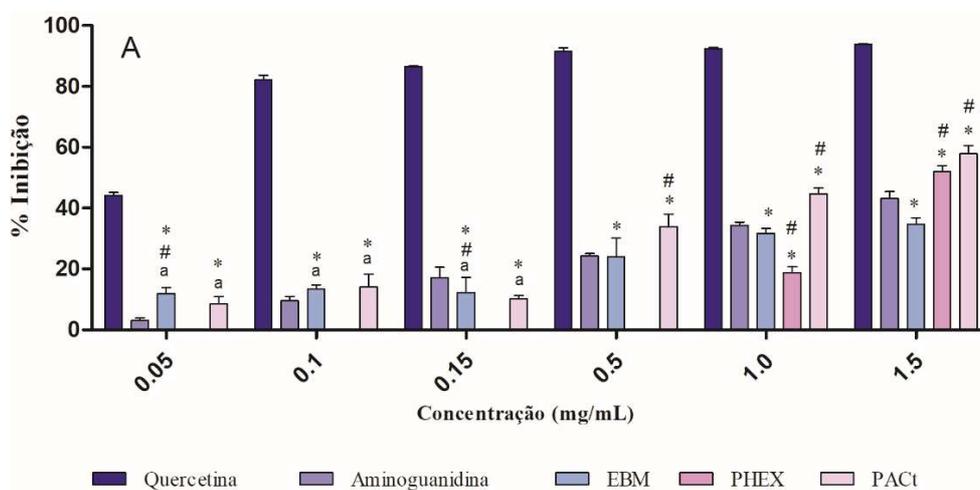
Analisando de maneira geral, é possível observar com os resultados obtidos que para o perfil antioxidante dos extratos de *P. aculeata* no método do descoramento do β caroteno, PHEX se mostrou mais eficiente, seguido pelo EBM, PDCM, PAcEt e PHM. Quanto à capacidade de redução de radicais livres, no DPPH todas as amostras, exceto PHM, se mostraram estatisticamente iguais em relação a quercetina; na inibição da produção de nitrito, a PHEX apresentou uma melhor ação quando comparada aos padrões, seguida pelo EBM, PDCM, PAcEt e PHM. No método de redução do fosfomolibdênio, a PAcEt obteve um percentual melhor em relação às outras amostras. Isso pode ocorrer visto que as amostras são extratos complexos, compostos por constituintes de diversas polaridades, além de que esses métodos antioxidantes detectam características variáveis nas amostras, explicando a razão de diferentes métodos de detecção levarem à diferentes resultados (SIM; SRI NURESTRI; NORHANOM, 2010). Porém, de maneira geral, PHEX e PAcEt, foram as mais promissoras.

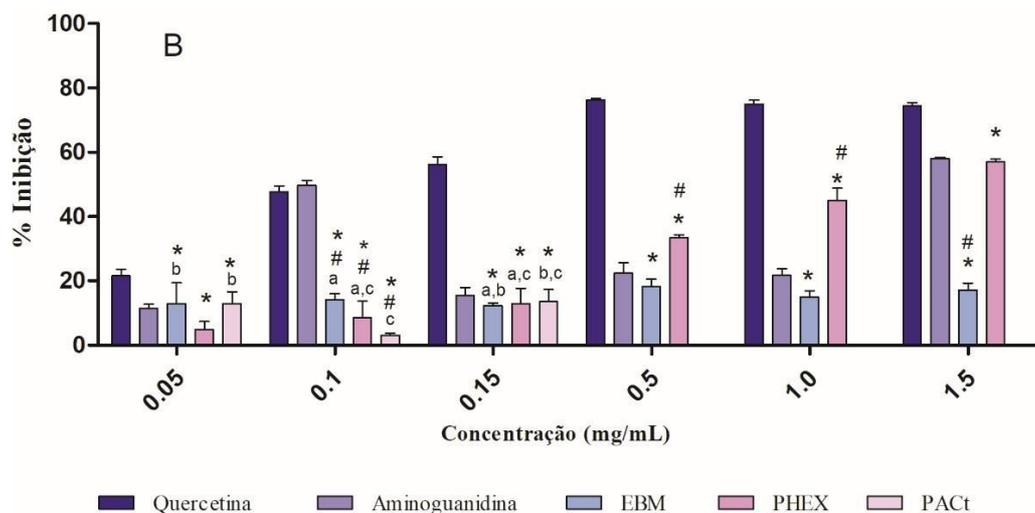
5.4 AVALIAÇÃO IN VITRO DA ATIVIDADE ANTIGLICANTE

O método fundamenta-se na reação entre o BSA e a frutose e/ou glicose (açúcar), que favorece a formação de AGEs que são mensuradas por um subconjunto de produtos fluorescentes, como a pentosidina e a argipiridina. Avalia-se a inibição da fluorescência específica gerada durante o curso da glicação e consequente formação de AGEs (FARSI et al., 2008). Como controle positivo foi usado a aminoguanidina que já possui atividade descrita na inibição da formação de compostos intermediários de carbonila, e a quercetina que também já demonstrou uma potente ação antiglicante em todas as etapas da glicação (ASHRAF et al., 2015; KUMAR PASUPULATI; CHITRA; REDDY, 2016).

Os valores referentes à atividade antiglicante da aminoguanidina, quercetina, EBM, PHEX e PAcEt em diferentes concentrações após 7 dias estão representados na figura 14 (A) e (B), respectivamente.

Figura 14 - Percentual de inibição da glicação do extrato e partições das folhas de *P. aculeata* na presença da frutose (A) e glicose (B).





Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores em cada coluna representam a média \pm desvio padrão das concentrações ($\mu\text{g/ml}$). ANOVA twoway, seguido pelo teste de Bonferron. Valores significativos: * Valores significativamente diferentes da quercetina ($p < 0,001$); # Valores significativamente diferentes da Aminoguanidina ($p < 0,001$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,05$). Legenda: EBM: extrato bruto metanólico; PHEX: partição em hexano; PACt: partição em acetato de etila.

Sabe-se que a susceptibilidade à glicação está vinculada à estrutura do açúcar, sendo relacionada com forma de cadeia aberta, que varia de 0,0002% para glicose a 0,7% para frutose. Isso justifica a glicose, mesmo sendo mais estável, ser o açúcar menos reativo, e a frutose e seus derivados mais reativos. Outros fatores que influenciam incluem o comprimento da cadeia do açúcar e a reatividade dos seus grupos funcionais. A glicose é o açúcar mais comumente encontrado em sistemas biológicos e que mais contribui para a glicação de proteínas, podendo também ser convertida em frutose através da via do polioli. A frutose é um açúcar natural comum na dieta diária, sendo ingerido através de uma alimentação natural, mas também pelos industrializados através da adição usual do xarope de frutose a bebidas industrializadas (BARBOSA et al., 2016; TORRES et al., 2018; VISTOLI et al., 2013). Dado a importância desses dois açúcares na formação de AGEs, ambos foram avaliados.

Como demonstrado na Figura 15 A e B, as amostras reagiram de maneiras diferentes de acordo com o açúcar usado, porém atingindo de maneira semelhante os mesmos percentuais de inibição. A quercetina atuou na glicação de maneira mais eficiente com a frutose atingindo percentual de 44% na menor concentração, conforme já era esperado. Com a glicose esse percentual foi de 20%.

Em relação à frutose, o EBM e a PAcEt se mostraram semelhantes estatisticamente até a concentração de 0,15 mg/mL, porém em apenas uma concentração o EBM se encontrou menor que a aminoguanidina. Nas maiores concentrações o PAcEt se mostrou melhor que a aminoguanidina com percentuais de inibição de 33,9%, 44,75% e 57,83%. O PHEX não mostrou atividade nas menores concentrações, atingindo 52% de inibição na maior concentração. Utilizando a glicose, os resultados obtidos das amostras se mostraram semelhantes na concentração de 0,15 mg/mL variando entre 12% e 13%, não se mostrando diferentes estatisticamente da aminoguanidina. Nas maiores concentrações a PHEX atingiu valores de 33%, 45% e 57%, sendo maior ou igual aos da aminoguanidina.

Nesse sentido, podemos atribuir uma melhor atividade antiglicante às maiores concentrações de PHEX e PAcEt, para ambos açúcares quando comparadas à aminoguanidina. Esse resultado corrobora com a literatura que associa a atividade antiglicante à presença de substâncias fenólicas (FARSI et al., 2008), que nessas amostras tiveram uma maior concentração. Porém, se correlacionarmos com a atividade antioxidante, as amostras se comportaram de maneira diferente, pois o EBM e PHEX foram as que apresentaram melhor atividade antioxidante nos métodos avaliados.

5.5 AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR

A viabilidade celular foi mensurada através do ensaio MTT. Esse método baseia-se na redução do MTT (cor amarela) em cristais de formazan (cor púrpura) por células viáveis com metabolismo ativo. O formazan é quantificado e a intensidade da cor está proporcionalmente relacionado ao número de células viáveis. Este ensaio é amplamente utilizado para avaliar os efeitos citotóxicos *in vitro* de drogas em linhas celulares (BAHUGUNA et al., 2017; RISS et al., 2004; VAN MEERLOO; KASPERS; CLOOS, 2011).

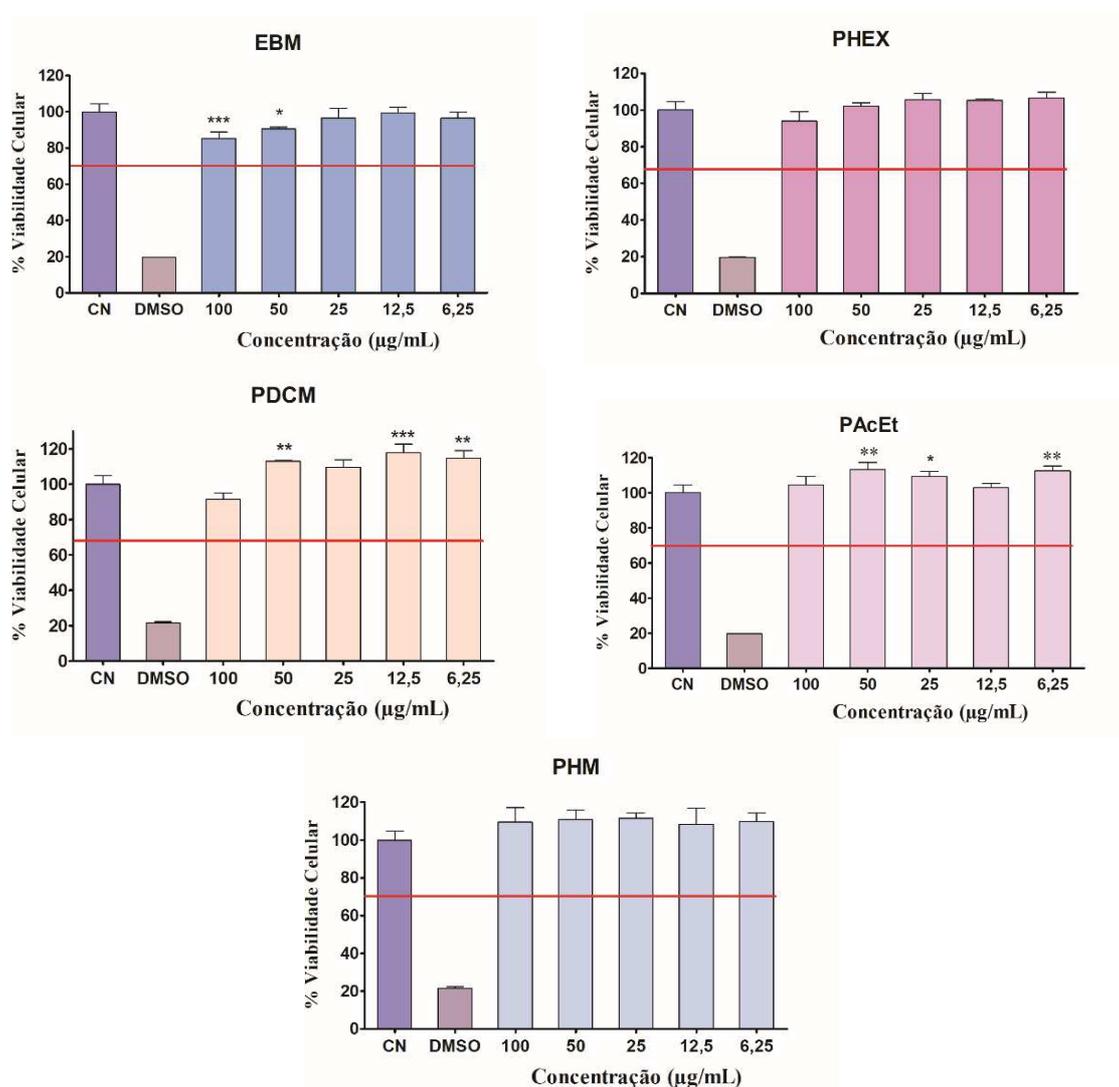
A espécie *P. aculeata* é conhecida por suas propriedades nutricionais, como alto teor de proteínas, minerais, vitaminas e fibras (SILVA et al., 2018), porém há poucos estudos sobre sua toxicidade.

Um estudo realizado por Pinto et al (2015b) avaliou uma formulação com extrato hexânico de *P. aculeata* quanto à irritação dérmica aguda, mostrando que a formulação não causou irritação. O mesmo autor, em outro estudo demonstrou que formulações com extrato hexânico e hidrometanólico aceleraram o processo de

cicatrização de feridas em camundongo (PINTO et al., 2016). A fim de corroborar esses resultados, avaliou-se neste trabalho como o extrato e partições de *P. aculeata* se comportariam frente a células encontradas na pele como queratinócitos (HaCat) e fibroblasto (L929).

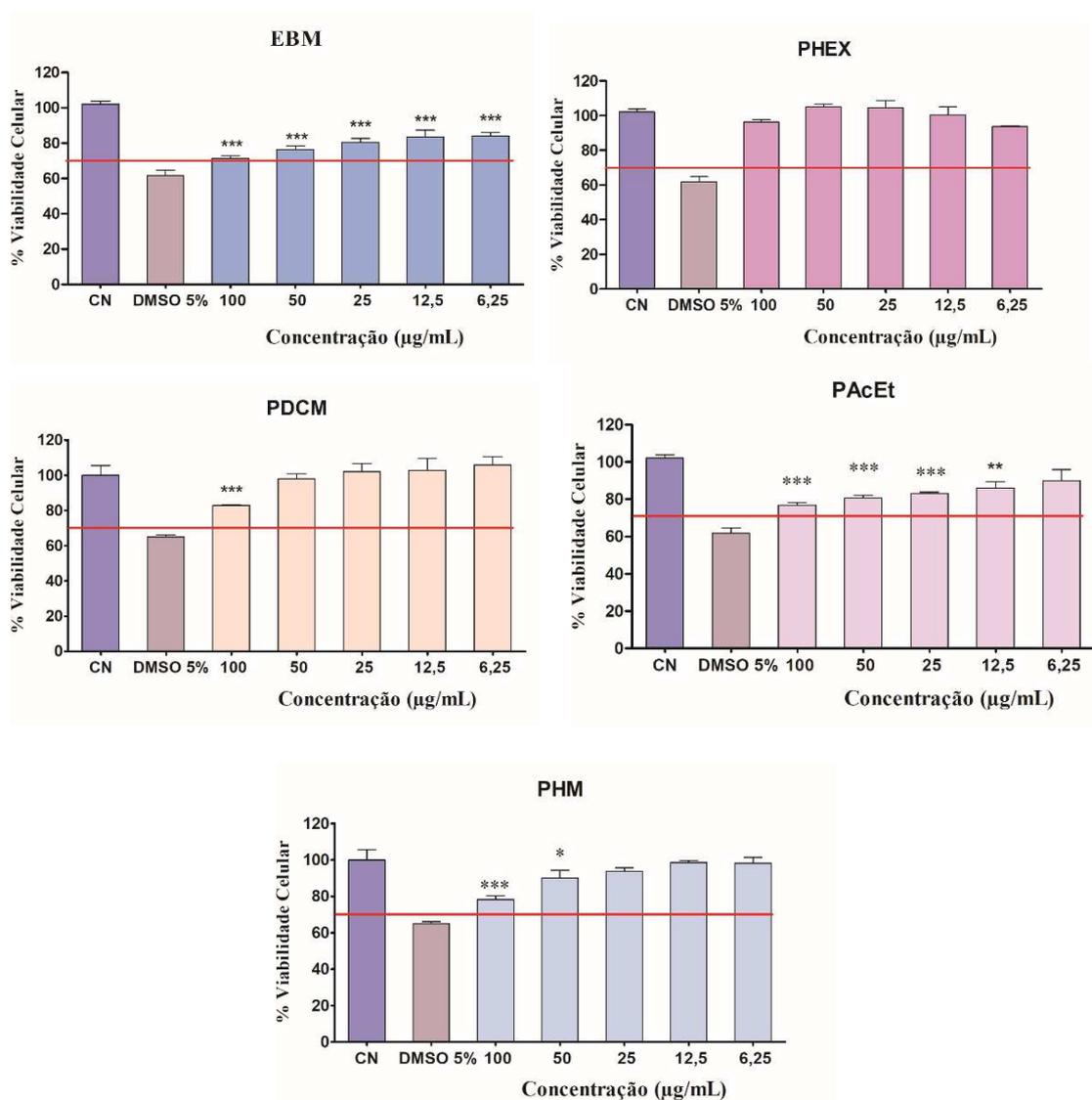
As duas linhagens de células foram tratadas com concentrações de extratos variando de 100 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$ e os resultados estão representados na Figura 15 e 16.

Figura 15 - Viabilidade celular das células HaCat frente ao extrato e partições das folhas de *Pereskia aculeata*



Os ensaios foram realizados em quadruplicata e os valores em cada coluna representam a média \pm desvio padrão das concentrações ($\mu\text{g/mL}$). ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$). Valores significativos; **Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0,01$); ***Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0,001$). Legenda: EBM: extrato metanólico; PHEX: partição em hexano; PDCM: partição em diclorometano; PAcEt: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

Figura 16 - Viabilidade celular das células L929 frente ao extrato e partições das folhas de *Pereskia aculeata*



Os ensaios foram realizados em quadruplicata e os valores em cada coluna representam a média \pm desvio padrão das concentrações ($\mu\text{g/mL}$). ANOVA seguido pelo teste de Bonferroni. *Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0,05$); **Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0,01$); ***Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0,001$). Legenda: EBM: extrato metanólico; PHEX: partição em hexano; PDCM: partição em diclorometano; PAcEt: partição em acetato de etila; PHM: partição hidrometanólica.

Segundo a ISO 10993-5 (2009) é considerado efeito citotóxico quando há redução da viabilidade celular em mais de 30%, o que não foi observado nesse experimento visto que na presença dos extratos, em todas as concentrações, a viabilidade celular foi acima de 70%.

Ademais, com os resultados observados é possível sugerir que a amostra PHEX possui ação cicatrizante, visto que apresentou resultado superior ao controle negativo nas duas linhagens celulares nas concentrações de 50 a 12,5 µg/mL, corroborando com estudos realizados por Pinto et al (2016).

Esse efeito é sugerido uma vez que queratinócitos e fibroblastos são células que restabelecem a composição normal da matriz celular e extracelular da pele, e estão envolvidas nos diversos estágios da cicatrização (CHIGURUPATI et al., 2012; DAS; BAKER, 2016). As outras amostras são potenciais candidatas para estudos relacionados a cicatrização.

6 CONCLUSÃO

Diante do exposto é possível dizer que este trabalho contribui de maneira significativa para o conhecimento e estudo da espécie *P. aculeata*.

A análise da constituição química da PHEX nos permite inferir que ela possui dentre seus componentes, constituintes triterpênicos como taraxerol e taraxasterol, fitoesteróis como campesterol, estigmasterol e sitosterol, além de fitol e tocoferol, relatado pela primeira vez na espécie.

De maneira diversa, todas as amostras demonstraram possuir atividade antioxidante, podendo destacar a PHEX que em distintos testes se destacou.

Para atividade antiglicante PHEX e PAcEt apresentaram melhor resultado.

As amostras não se mostraram citotóxicas no teste de viabilidade celular frente as linhagens L2929 (fibroblasto) e HaCaT (queratinócito).

Este estudo encoraja perspectivas futuras para estudos químicos, como identificação e isolamento dos outros extratos, como PAcEt e PDCM, e estudos farmacológicos mais refinados das diversas partições de *P. aculeata*.

CAPÍTULO 2

ESTUDO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÃO TÓPICA
INFLATIV CONTENDO *Pereskia aculeata* Miller

1 INTRODUÇÃO

A medicina tradicional desenvolveu conhecimento e experiência quanto à seleção e identificação de plantas, métodos de preparação, regulação de dose e toxicidade. No passado, isso auxiliou o desenvolvimento de diversos fármacos, podendo concluir que se aplicado esse conhecimento novamente, novos fármacos poderão ser desenvolvidos (YUAN et al., 2016).

Os fármacos originários de produtos naturais podem ser divididos em três classes: fitoterápicos, fitofármacos e fitocosméticos. Os fitofármacos são usados diretamente como insumos ativos para manipulação de medicamentos, pois são compostos químicos puros isolados de plantas e/ou seus derivados. Os medicamentos que possuem uma mistura de compostos químicos indefinidos, como extratos de plantas ou derivados são chamados de fitoterápicos. Não possuem substâncias isoladas nem associações com ativos sintéticos. Os fitocosméticos são produtos que possuem ativo de origem vegetal, seja extrato ou óleo essencial, definindo a ação do produto (FIGUEIREDO; MARTINI; MICHELIN, 2014; PIMENTEL et al., 2015).

Um levantamento realizado por Berlinck et al. (2017) constata que a busca por novos produtos à base de produtos naturais vem aumentando, e uma das justificativas é o fato de que nos últimos 15 anos houve um aumento no aporte de financiamentos voltados à ciência brasileira. A pesquisa realizada no Brasil se encontra, em 69% de sua extensão, nas universidades brasileiras.

Inspirados por essa busca da promoção da saúde ou prevenção de doenças no período de 1981 a 2010, os fármacos registrados no mundo com relação direta com a biodiversidade somaram pelo menos 27% (PIMENTEL et al., 2015; YUAN et al., 2016). E no período de 1940 e 2014 estima-se que das 175 moléculas aprovadas para o tratamento do câncer, 49% foram oriundas de produtos naturais ou diretamente derivados deles (NEWMAN; CRAGG, 2016).

Segundo Lordaniet al. (2018), dentre os fármacos desenvolvidos pela indústria farmacêutica para cura de doenças, apenas 1 a 3% de todas essas drogas destinam-se ao uso na pele ou em feridas cutâneas, dentre estes um terço obtido a partir de plantas.

No intuito de avaliar extratos vegetais e derivados, o grupo de pesquisa do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos (LPNB) do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Juiz de Fora, desenvolve pesquisas relacionadas a busca de

novas moléculas e elaboração de produtos finais acabados (fitoterápicos e fitocosméticos).

Nesse contexto, esse trabalho traz o estudo da estabilidade de formulações desenvolvidas por Pinto (2017) com extrato (PHEX) de *Pereskia aculeata* Miller (INFLATIV 6% e 12%) registrada com o número da patente BR10201501757 INPI, que se mostraram promissoras na cicatrização, acelerando o fechamento da ferida, aumentando a taxa de fluxo sanguíneo e deposição de colágeno, apresentando menos fibroplasia, vasos sanguíneos e células inflamatórias no local (PINTO et al., 2016), a fim de registrar um novo fármaco para uso tópico.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PELE E OS PRODUTOS NATURAIS

A pele é uma barreira fisiológica e anatômica entre o ambiente e o organismo, ela promove proteção contra agressões físicas, químicas e microbiológicas. Nos animais ela determina as formas e características das raças. É considerada um órgão sensorial sendo sensível ao calor, ao frio, à dor, ao tato e à pressão, além de participar da síntese de vitamina D₃, na regulação da temperatura corpórea e secreção de eletrólitos, dentre outras funções (FERNANDES, 2017; LUCAS, 2008; SOUSA & VARGAS, 2004).

Nos animais, os pelos e a pele podem variar quali e quantitativamente entre as diferentes espécies, entre as raças dentro de uma mesma espécie e individualmente entre animais de uma mesma raça, dependendo da idade e do sexo. Nos animais de estimação de pequeno porte, como gatos e cachorros a espessura da pele varia de 0,4 a 2 mm e de 0,5 a 5 mm, respectivamente, e os pelos são mais abundantes nas áreas mais espessas, acompanhando o comportamento da pele (LUCAS, 2008).

As feridas cutâneas são um distúrbio da integridade dos tecidos epiteliais e subjacentes devido à violência ou trauma, podendo causar alterações anatômicas e funcionais, sendo uma apresentação comum na prática de cuidados de pequenos animais (DUQUE et al., 2016; KOŽÁR; HAMILTON; KOŠČOVÁ, 2019; LORDANI et al., 2018).

A cicatrização é um processo dinâmico e complexo que envolve os processos de inflamação, reepitelização, formação de tecido granulado, neovascularização e remodelamento da matriz extracelular, sendo necessário o envolvimento de diversas células e mediadores químicos, que leva ao restabelecimento da integridade e homeostase tecidual gerando a substituição do tecido lesionado por um tecido conjuntivo vascularizado (DUQUE et al., 2016; KOŽÁR; HAMILTON; KOŠČOVÁ, 2019; LORDANI et al., 2018; PINTO et al., 2016).

Em animais domésticos, o tratamento e cura de feridas cutâneas são mais difíceis, pois dependem de um manejo complexo, controle de infecção local e/ou sistêmica, proteção dos tecidos subjacentes e indução de regeneração do tecido cutâneo, tendo o tipo de lesão determinativo se o processo de cura será agudo ou crônico (LORDANI et al., 2018; ZUBIN et al., 2015).

Uma cicatrização bem-sucedida de feridas muitas vezes depende da aplicação de uma intervenção terapêutica apropriada. Os métodos atuais usados para tratar feridas incluem desbridamento, enxertos de tecidos, irrigação, enzimas proteolíticas e antibióticos, porém são métodos frequentemente caros, ineficazes e podem induzir reações adversas. Portanto, novas opções alternativas para auxiliar no processo de cicatrização com menos efeitos adversos, menor custo e menor tempo de cicatrização se fazem necessárias (DUQUE et al., 2016; KOŽÁR; HAMILTON; KOŠČOVÁ, 2019; LORDANI et al., 2018; ZUBIN et al., 2015).

Historicamente, produtos naturais com propriedades terapêuticas vêm sendo utilizados na medicina popular na prevenção e tratamento de diversas doenças. Esse conhecimento foi levado às grandes indústrias farmacêuticas fazendo com que novos fármacos fossem descobertos, e hoje aproximadamente 75% dos agentes anti-infecciosos são produtos naturais ou derivados (ALVES et al., 2014; LORDANI et al., 2018).

Neste contexto, estudos com plantas medicinais com efeitos cicatrizantes vêm sendo realizados e alcançam resultados promissores. Em uma revisão realizada por Lordani et al. (2018) são relatadas plantas com atividade cicatrizantes, com a espécie *Leea macrophylla* que é descrita com efeitos de cura, pois aumenta a síntese de colágeno, estimula a produção de antioxidantes, reduz os níveis de fatores pró-inflamatórios e melhora a proliferação celular. Um unguento feito a partir de *Struthanthus vulgaris* estimulou o fechamento de lesões, a formação de tecido granuloso, a proliferação e a organização das fibras de colágeno. *Cynodon dactylon* apresentou atividade antioxidante e estimulou a formação do colágeno e a cicatrização. A *Caesalpinia mimosoides* estimulou a reepitelização da camada epidérmica e a contração das lesões.

Estudo realizado por Duque et al. (2016) demonstrou que um gel fitoterápico contendo extrato de *Cecropia pachystachya* promoveu a aceleração do processo de cicatrização quando comparado ao grupo controle.

2.2 INDÚSTRIA VETERINÁRIA

Por possuírem uma cadeia produtiva semelhante, a indústria farmacêutica veterinária compartilha muitos fármacos na sua terapêutica com a indústria farmacêutica de saúde humana, a primeira possuindo função complementar ao segundo, uma vez que facilita a diluição dos elevados custos de pesquisa e desenvolvimento (P&D), leva a

diversificação de suas atividades e aumenta a competitividade entre as indústrias (BARBOSA; CARRER; RUIZ, 2017; CAPANEMA et al., 2007).

Pode-se caracterizar a indústria veterinária em dois modelos de atuação: o primeiro são as grandes indústrias internacionais químico-farmacêuticas com atuação mundial que caracterizam-se por liderar o processo de inovação, e o segundo são as indústrias nacionais de pequeno porte, essas especializadas em necessidades locais e nichos de mercado (BARBOSA; CARRER; RUIZ, 2017; CAPANEMA et al., 2007).

O setor que mais cresce é o setor de animais de estimação (pet). No ano de 2016, o Brasil possuía uma população que ultrapassava 130 milhões de pet, ocupando o terceiro maior mercado pet do mundo em faturamento (Figura 17), (CNDL, 2017; SEBRAE, 2017).

Figura 17 - População de animais no Brasil



O Brasil é o 2º país com maior população de cães, gatos e aves e o 4º maior do mundo em população total de animais de estimação. Fonte:(ABINPET, 2018)

No ano de 2016 houve um aumento 4,9% no faturamento em relação a 2015, enquanto no ano de 2017 esse crescimento foi de 7,9% em relação ao ano anterior (Figura 18) (SEBRAE, 2017).

Figura 18 - Faturamento do mercado pet brasileiro em 2017



Pet Food (alimento completo), Pet Care (equipamentos, utilidades e produtos para higiene e beleza) e Pet Vet (medicamentos veterinários). Fonte:(ABINPET, 2018)

Em pesquisa realizada pela Confederação Nacional de Dirigentes Lojistas de São Paulo (CNDL-SP) (2017) foi investigado o perfil e hábitos de compra de produtos/serviços para animais de estimação onde a prioridade dos proprietários são propiciar uma alimentação saudável (79,2%) aos animais e cuidados com a saúde (78,8%). O que representa um gasto de 88% com rações e 50% com medicamentos e vitaminas.

Atualmente há um crescimento na procura por produtos naturais, fazendo com que o uso de medicamento fitoterápico e plantas medicinais esteja em ascensão. Isso repercute nos animais por influência dos proprietários, gerando uma oportunidade no desenvolvimento de novos fitoterápicos veterinários (BRUNO; MARQUES; CARDOSO, 2016).

A regulamentação da legislação veterinária fica a cargo do Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), que aborda a produção de produtos veterinários, inclusive os de origem vegetal. No entanto existe pouca regulamentação sobre fitoterápicos veterinários (BRUNO; MARQUES; CARDOSO, 2016; GOLDIM, 2007).

No entanto, existem empecilhos que dificultam a inovação na indústria veterinária como a proteção da propriedade intelectual, a capacidade de produção, bem como a estratégia comercial. Assim, métodos são elaborados para minimizar essa dificuldade, como o desenvolvimento de produtos similares àqueles inovadores e parcerias com universidades, transformando em novas tecnologias produtivas o conhecimento adquirido (BARBOSA et al., 2017; BERLINCK et al., 2017).

2.3 ESTUDO DA ESTABILIDADE DE FORMULAÇÃO SEMISSÓLIDA

Emulsões são preparações farmacêuticas semissólidas de dois ou mais líquidos imiscíveis, tendo como condição para homogeneidade a junção de uma fase dispersa insolúvel na fase dispersante, e neutralizando as forças de tensão da superfície na interface por um tensoativo, responsável pela união das duas fases. São compostas por uma fase aquosa, uma fase oleosa e emulsificantes, sendo possível incorporar compostos com funções específicas. Podem ser classificadas de acordo com a hidrofília ou lipofília da fase dispersante, classificando-se em emulsões óleo em água (O/A) ou água em óleo (A/O) (KOWALSKA; ZIOMEK; ZBIKOWSKA, 2015; MENDONÇA et al., 2009; ZANIN et al., 2001).

Porém, emulsões são sistemas termodinamicamente instáveis e podem sofrer diversas alterações por fatores ambientais e/ou relacionadas ao próprio produto, como pH, processo de produção, excipientes e processos físico químicos. Dentre as alterações pode-se destacar separação gravitacional, floculação, coalescência, inversão de fases, entre outros (KOWALSKA; ZIOMEK; ZBIKOWSKA, 2015; SANTOS, 2015; SPAGNOL et al., 2016). Portanto, é necessário manter a estabilidade farmacêutica das emulsões a fim de não haver perda do efeito desejado.

As agências reguladoras brasileiras como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) são os órgãos responsáveis por elaborar normas técnicas, pela fiscalização e acompanhamento do uso de medicamento por humanos e animais, respectivamente. Em outros países a regulamentação para o uso de medicamentos em humanos é feito pela *Food and Drug Administration* (FDA), nos Estados Unidos e a Agência Europeia para Avaliação de Produtos Medicinais (EMA) na Europa (GOLDIM, 2007).

A estabilidade de produtos farmacêuticos veterinários é de responsabilidade de regulamentação do MAPA. Atualmente vigora a Instrução Normativa (IN) Nº 15, de 09 de maio de 2005, porém no ano de 2011 foi aberta uma consulta pública para atualização da IN que foi registrada pela PORTARIA SDA Nº 105, de 18 de maio de 2011 (BRASIL, 2011; BRASIL, 2017).

A estabilidade de um produto depende de condições intrínsecas e extrínsecas, onde no primeiro caso está relacionado às interações no próprio produto, do produto com o material de acondicionamento e fatores físico-químicos, como pH, reações de oxidação-redução e hidrólise. No segundo caso está relacionado à interação com o meio externo ao qual o produto está exposto, como incidência de luz, tempo, temperatura, oxigênio, umidade, vibração e microrganismos (BRASIL, 2004; BRASIL, 2005; ISAAC et al., 2008).

Segundo SANTOS (2015) e ZANIN et al. (2001), a estabilidade de um produto está relacionada com a estabilidade física, química, microbiológica, terapêutica e toxicológica do mesmo, onde:

- Estabilidade física: aborda a integridade da substância ativa e seus produtos de degradação. Determinando as características físicas do medicamento e reter sua forma inalterada. Sendo afetada por vibrações e impactos, flutuações de temperatura e umidade;

- Estabilidade química: é a de maior importância e de fácil avaliação, está relacionada com a capacidade do produto em manter a identidade molecular e conformação espacial. Pode ser alterada por temperatura, umidade, luz, pH, entre outras;
- Estabilidade microbiológica: está relacionada a manutenção da esterilidade ou resistência ao crescimento microbiano, dentro dos requisitos especificados;
- Estabilidade terapêutica: verifica-se que não há alteração significativa no efeito terapêutico esperado;
- Estabilidade toxicológica: verifica-se que não há aumento na toxicidade por produtos de degradação, tanto pela substância ativa como por excipientes.

O estudo da estabilidade é um procedimento preditivo, onde é possível avaliar o desempenho, segurança, eficácia e a aceitação pelo consumidor do produto. É baseado em dados obtidos de comportamento do produto sob determinadas condições de estresse que visam acelerar alterações passíveis de ocorrer em determinado intervalo de tempo, que podem ocorrer no período de validade. No entanto, condições extremas podem provocar aceleração no envelhecimento do produto que não ocorreria normalmente. Porém, mesmo com esse procedimento para prever o comportamento do produto, os resultados não são absolutos, mas existe a probabilidade de sucesso (BRASIL, 2004).

No ano de 2005, as zonas climáticas foram divididas em cinco de acordo com a prevalência anual das condições climáticas, sendo necessário realizar os estudos de estabilidade observando os critérios estabelecidos para o qual o produto é destinado. A ANVISA considerou as condições da região IV-B, clima quente e muito úmido, como sendo as do Brasil (BRASIL, 2005; ORIQUI et al., 2011).

Um teste importante para a triagem do desenvolvimento de uma formulação é o teste de centrifugação, pois permite observar se a homogeneidade da fórmula permanece íntegra mesmo depois de passar por período de estresse forçado, havendo necessidade de reformulação a qualquer sinal de instabilidade. Quando a formulação é aprovada nesse teste ela segue para os testes de estudo de estabilidade (FIGUEIREDO; MARTINI; MICHELIN, 2014).

Segundo a IN nº 15 de 2005 do MAPA o estudo da estabilidade pode ser dividido em: estudo de estabilidade acelerado, estudo de estabilidade de longa duração e estudo de estabilidade de acompanhamento. Sendo definidos como:

- Estudo de estabilidade acelerado (EEAce): é projetado para acelerar a degradação química e/ou mudanças físicas de um produto em condições forçadas de armazenamento em um período relativamente curto de tempo;
- Estudo de estabilidade de longa duração (EELD): os resultados são usados para confirmar o prazo de validade. É realizado para verificar as características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas de um produto durante o prazo de validade em um período igual ou superior ao estimado;
- Estudo de estabilidade de acompanhamento (EEA): é um estudo de longa duração, realizado periodicamente a fim de verificar se os produtos mantêm suas características físicas, químicas, biológicas e microbiológicas similares aos apresentados para estabelecimento do prazo de validade.

Segundo legislação do MAPA, é possível ter a concessão do prazo de validade provisório de 24 meses, sendo necessário apenas apresentar o resultado do EEAce, desde que o produto cujas substâncias ativas sejam consideradas estáveis, com degradação igual ou inferior a 5%, e os outros parâmetros de qualidade permanecem dentro das especificações (BRASIL, 2005).

Para a concessão do prazo de validade provisório o EEACe deverá acontecer em câmara climatizada, nas condições observadas na Tabela 8.

Tabela 8 - Condições para Estudo de Estabilidade Acelerada (EEACe)

Condições	Tempo de teste	Frequência dos testes
40°C ± 2°C/75 % ± 5% de UR	Período de 6 (seis) meses	0; 1; 2; 3 e 6 meses
50°C ± 2°C/90 % ± 5% de UR	Período de 3 (três) meses	0; 1; 2 e 3 meses

Fonte: BRASIL, 2005

Os testes EELD devem acontecer em câmara climatizada na(s) condição(ões) crítica(s) de temperatura de armazenamento (Tabela 9), nos tempos 0; 3; 6; 9; 12; 18 e 24

meses; e anualmente, após o segundo ano até o prazo de validade declarado. Os produtos de degradação devem ser identificados e quantificados, quando apresentarem relevância terapêutica ou toxicológica, a fim de se obter concessão de prazo de validade definitivo.

Tabela 9 - Condições para teste de Estudo de Estabilidade de Longa Duração (EELD)

Recomendações	Condições do teste
Conservar à temperatura ambiente	30°C ± 2°C/ 65% ± 5% de UR
Sensíveis a temperaturas baixas	15°C ± 2°C/ 65% ± 5% de UR
Conservar sob refrigeração, congelado ou a -18°C	Procedimento é análogo ao descrito para os produtos conservados à temperatura ambiente, com exceção das temperaturas críticas

Fonte: BRASIL, 2005

O EEA depende da quantidade de produção anual que a empresa pretende produzir do medicamento, pois em uma produção igual ou superior a 15 lotes/ano os testes devem ocorrer pelo menos em um lote produzido anualmente. Quando a produção é inferior a 15 lotes/ano esse espaço de tempo pode ser ampliado, sendo necessário realizar os testes pelo menos em um lote a cada dois anos, sendo necessário realizar os testes no tempo 0 e após cada ano, até o prazo de validade declarado. (BRASIL, 2005).

As características e forma do produto farmacêutico, assim como os componentes da formulação fazem com que o pesquisador possa adequar quais serão os parâmetros a serem avaliados, tendo a precaução de selecionar os testes que melhor representem o conjunto de parâmetros que avaliam a estabilidade do produto, buscando indícios que levem a conclusões sobre a estabilidade e com o objetivo de investigar as formulações em etapas, devendo estar atento para não extrapolar as condições, pois ao invés de acelerar o envelhecimento do produto pode causar alterações exacerbadas (BRASIL, 2004; FIGUEIREDO; MARTINI; MICHELIN, 2014).

Os parâmetros a serem avaliados podem ser classificados em organolépticos, físico-químicos e microbiológicos, conforme mostrado na Tabela 10.

Tabela 10 - Parâmetros avaliados na formulação

Parâmetros	Avaliar
Organolépticos	Aspecto, cor, odor e sabor (quando aplicável)
Físico – químicos	pH, viscosidade, densidade, e monitoramento de componentes da formulação
Microbiológicos	Contagem microbiana e Challenge Test (teste de desafio do sistema conservante).

Fonte: (BRASIL, 2004)

Para o início do estudo de acompanhamento é necessário que o estudo de longa duração já tenha sido concluído, pois não pode haver alterações no processo de obtenção do produto, material de embalagem primária ou mesmo na formulação após o início do mesmo (CASTRO; CHINCHILLA, 2005).

O estudo de estabilidade é importante não só para estabelecer um prazo de validade para o produto, mas também durante processos de petição de registro de medicamento (inovador, genérico, similar) e alterações de pós-registro, a fim de complementar a documentação exigida pelos órgãos reguladores (ANVISA, MAPA, FDA, entre outros) (CASTRO; CHINCHILLA, 2005).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar o estudo da estabilidade acelerada com INFLATIV, necessário para registro junto ao MAPA.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Preparar o extrato bruto metanólico e a partição hexânica de *P. aculeata*;
- Produzir a formulação INFLATIV nas concentrações 6% e 12%;
- Realizar o estudo de estabilidade acelerado preconizado pelo Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) por 4 meses, analisando:
 - Características organolépticas;
 - Densidade;
 - pH;
 - Análise de degradação do fitol.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 PREPARO DE FORMULAÇÃO INFLATIV

A formulação tópica objeto do estudo está registrada sob o número de patente BR10201501757, foi preparada na forma de uma emulsão água/óleo, a qual está descrita na Tabela 11.

A partição hexânica de *P. aculeata* foi incorporada nas concentrações de 6% e 12% na formulação, a qual se deu o nome de INFLATIV.

Tabela 11 - Constituição da formulação farmacêutica de uso tópico na qual foi incorporada partição hexânica 6% e 12%

Constituintes	Concentração
Cera emulsionante	20%
Quelante	0,1%
Conservante 1	0,05%
Umectante	5%
Conservante 2	0,1%
Outros adjuvantes	5%
Água destilada	qsp

4.2 ESTUDO DA ESTABILIDADE

Para o estudo de estabilidade acelerada foi utilizado a IN nº 15, de 09 de maio de 2005, descrita pelo MAPA para produtos veterinários e como auxiliar o guia de produtos cosméticos da ANVISA (2004), uma vez que a legislação não especifica quais testes devem ser executados, deixando a critério do desenvolvedor.

As amostras de INFLATIV 6% e 12% foram acondicionadas em frascos de vidro transparente com tampa metálica de rosca. Foram colocadas 50 g em duplicata, para pH e densidade, e 5 g para as características organolépticas (Figura 19 A e B).

Foi realizado o estudo de estabilidade acelerado para as duas formulações de INFLATIV. Ambas foram acondicionadas a $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\% \pm 5\%$ de UR por 3 meses, com frequência de análise nos tempos 0 (quando preparada), 1 mês, 2 meses e 3 meses,

Figura 19 - INFLATIV 6% (A) e 12% (B) envasado em vidros transparente



4.2.1 Teste de estresse físico

O teste de centrifugação é sugerido pela ANVISA como preliminar para o desenvolvimento de uma nova formulação, uma vez que é possível simular como a formulação se comporta frente a fatores extremos, sendo possível uma adequação, se necessário (BRASIL, 2004).

Após preparar a formulação, 4 g de INFLATIV foram colocados em tubos de ensaio e centrifugados a 3000 rpm por 30 minutos a temperatura ambiente (25 °C). O teste foi realizado em triplicata. O produto deve permanecer estável, sem divisão de fases, qualquer sinal de instabilidade há necessidade de reformulação.

4.2.2 Características organolépticas

São avaliadas características macroscópicas como aspecto, cor, odor e uniformidade, conservando as propriedades físicas originais. São avaliados os parâmetros de aceitação do produto pelo consumidor (BRASIL, 2004).

Durante o período de estabilidade uma amostra como referência será utilizada para realizar a comparação. Uma tabela para avaliar as características foi elaborada segundo ISAAC et al., 2008 (Tabela 12).

Tabela 12 - Parâmetros a serem avaliados da característica organoléptica da formulação

COR	NATURAL	<input type="checkbox"/>
	LEVEMENTE MODIFICADA	<input type="checkbox"/>
	MODIFICADA	<input type="checkbox"/>
	INTENSAMENTE MODIFICADA	<input type="checkbox"/>
ODOR	NATURAL	<input type="checkbox"/>
	LEVEMENTE MODIFICADA	<input type="checkbox"/>
	MODIFICADA	<input type="checkbox"/>
	INTENSAMENTE MODIFICADA	<input type="checkbox"/>
UNIFORMIDADE	NORMAL	<input type="checkbox"/>
	LEVEMENTE SEPARADA	<input type="checkbox"/>
	SEPARADA	<input type="checkbox"/>

Fonte: adaptado de ISAAC et al., 2008

4.2.3 Análise do potencial hidrogeniônico (pH)

Para avaliação do pH foi utilizado um pHmetro digital. Uma solução aquosa a 10% em água destilada de INFLATIV foi preparada.

4.2.4 Densidade relativa

A densidade foi realizada segundo descrito na Farmacopeia Brasileira (BRASIL, 2010) utilizando um picnômetro. Foi realizada a calibração do picnômetro por meio da determinação da massa do picnômetro vazio (m_v) e da massa de seu conteúdo com água (m_a) a 20 °C. A partir dessas medidas, foi calculada a massa da amostra pela diferença entre a massa do picnômetro com a amostra (m_p) e a massa do picnômetro vazio (m_v). A densidade relativa de cada amostra foi então calculada de acordo com a fórmula abaixo:

$$D = \frac{m_p - m_v}{m_a - m_v}$$

Em que:

D = densidade relativa (g/cm^3)

m_v = massa do picnômetro vazio (g)

m_p = massa do picnômetro com a amostra (produto) (g)

m_a = massa do picnômetro com água (g)

Na análise estatística foram comparados os valores dos dias coletados ao valor de densidade do primeiro dia.

4.2.5 Análise do perfil químico de INFLATIV por CG-EM

As duas concentrações de INFLATIV (6% e 12%) foram analisadas em cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas, afim de verificar o perfil da formulação recém preparada. As amostras foram preparadas a 1 mg/mL, solubilizadas em hexano grau CG, sonificadas por 30 minutos em temperatura de 40 °C, posteriormente centrifugadas a 3000 rpm por 20 minutos e então filtradas em filtro de 0,45 µm e levadas para análise em CG-MS. Um branco somente com a base foi realizado.

As amostras foram analisadas em CG-EM com coluna capilar do tipo DB-5MS com 0,25 µm de espessura do filme, de 30 m de comprimento e 250 µm de diâmetro interno. O gás de arraste foi hélio com fluxo 1,0 mL/minuto. Para PHEX, a temperatura do injetor foi de 270 °C, forno com temperatura inicial de 50 °C até 80 °C por 10 minutos (3 °C/min), de 80 °C até 200 °C por 10 minutos (12 °C /min), de 200 °C a 300 °C por 20 minutos (12 °C /min) e mais 35 minutos de isoterma final a 300 °C, totalizando 75 minutos de corrida. O espectrômetro de massas operou por impacto eletrônico (70 eV), sem fonte iônica.

Os componentes individuais foram identificados pela comparação de similaridade dos espectros de massa obtidos com aqueles presentes no banco de dados da biblioteca do espectrômetro de massas (WILEY 275.1).

Uma curva padrão com o creme antes da estabilidade foi construída com concentrações variando de 1,5 a 12%. As medidas foram realizadas em triplicata e os resultados foram expressos em porcentagem de comparação da formulação antes e após o estudo de estabilidade, usando o fitol como marcador químico. Para análise dos resultados foi usado regressão linear no Excel.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada pela ANOVA e comparados pelos testes de Bonferroni, os resultados foram apresentados como média ± desvio padrão e os cálculos foram realizados a partir do Software estatístico GraphPad Prism 5.0.

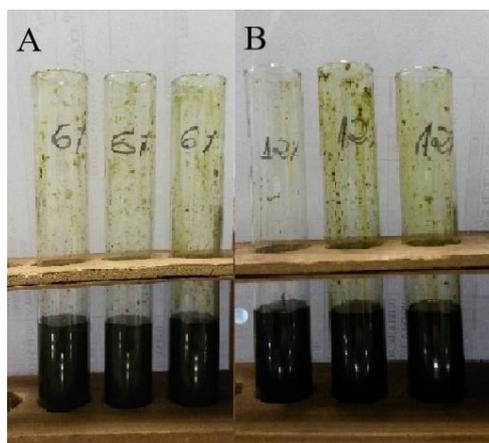
5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 CENTRIFUGAÇÃO

Neste teste, a amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 30 minutos, simulando aumento na força da gravidade, aumentando a mobilidade das partículas e antecipando possíveis sinais de instabilidade, como precipitação, separação de fases, formação de sedimento compacto, coalescência, entre outras.

Observou-se que não houve separação de fase, ao passar por processo de estresse, sugerindo a estabilidade do INFLATIV e descartando a necessidade de mudanças na formulação, nessa primeira análise.

Figura 20 - INFLATIV nas concentrações de 6% (A) e 12% (B), após centrifugação



5.2 CARACTERÍSTICAS ORGANOLÉPTICAS

INFLATIV apresentou coloração verde escura, característica da partição hexânica da planta, com odor característico e natural de extrato vegetal, mesmo após incorporado à base; e completamente uniforme, não apresentando diferenças organolépticas entre as duas concentrações.

As duas amostras mantiveram a uniformidade ao longo dos testes, porém as que ficaram expostas à temperatura alta, após 60 dias apresentavam uma consistência menos firme, o mesmo acontecendo com a base usada como controle. A coloração das amostras alterou ao longo do teste: as expostas às temperaturas baixa e ambiente apresentaram uma leve coloração verde metálica que foi escurecendo ao longo do tempo,

enquanto a exposta à temperatura alta apresentou uma coloração verde escura, todas sendo classificadas como modificadas, de acordo com a Tabela 11.

Dentre as características avaliadas, a que mais sofreu modificação foi o odor. A amostra exposta à alta temperatura foi a que mais se alterou, apresentando um odor rançoso, o que não foi observado na base utilizada como controle, classificando-a como modificada. A exposta à baixa temperatura alterou o odor somente após 90 dias, sendo classificada como levemente modificada.

O teste de estabilidade acelerado deveria acontecer durante o período de 6 meses (180 dias). Porém, no primeiro mês, uma amostra de INFLATIV 12% que estava à temperatura ambiente se apresentou contaminada, e o mesmo aconteceu após o terceiro mês (90 dias) com as duas amostras de INFLATIV 6% acondicionada à temperatura ambiente. Dessa forma, o estudo foi interrompido aos 90 dias.

5.3 CARACTERÍSTICAS FÍSICO-QUÍMICAS

5.3.1 pH

O pH cutâneo em cachorros apresenta uma larga variação (4,84 a 9,95), porém tende a ser mais alcalino. Essa variação ocorre entre as diferentes regiões anatômicas, dependendo do sexo, idade, alimentação e raça do animal (FERREIRA, 2010; OH; OH, 2010; ZAJAC et al., 2015). Em um estudo realizado por Oh; Oh (2010) foi observado que cachorros machos da raça Beagle apresentaram um pH cutâneo que variava de 6,7 a 8,5 de acordo com a região anatômica. Por tanto uma formulação que apresenta pH neutro é mais útil, uma vez que pode ser usada nas diversas regiões anatômicas e diversas raças.

É possível observar os valores do pH encontrado em INFLATIV, ao longo de 3 meses, nas Tabela 13 e 14, e para base controle na Tabela 15. O pH inicial de 6,64 foi encontrado para INFLATIV 6% e 6,78 para INFLATIV 12%, mostrando que ambos apresentaram pH variando entre o ácido e neutro.

Tabela 13 - Valores de pH para INFLATIV 6% nas diferentes situações de estresse

INFLATIV 6%			
Tempo (dias)	Temperatura		
	Ambiente	Baixa	Alta
0	6,64 ± 0,05	6,64 ± 0,05	6,64 ± 0,05
30	6,34 ± 0,1 ^a	6,17 ± 0,02 ^b	6,28 ± 0,05 ^{***d}
60	5,8 ± 0,26 ^{*a}	5,97 ± 0,01 ^{***b,c}	5,96 ± 0,42 ^{***e}
90	5,8 ± 0,23 ^{*a}	6,15 ± 0,11 ^{**c}	5,9 ± 0,11 ^{***d,e}

Os ensaios foram realizados em quadruplicata e os valores em cada coluna representam a média ± e.p.m. das concentrações. ANOVA twoway, seguido pelo teste de Bonferroni. *Valores significativamente diferentes do Tempo 0 (p<0,05); **Valores significativamente diferentes do controle negativo (p<0,01); ***Valores significativamente diferentes do controle negativo (p<0,001);

Tabela 14 - Valores de pH para INFLATIV 12% nas diferentes situações de estresse

INFLATIV 12%			
Tempo (dias)	Temperatura		
	Ambiente	Baixa	Alta
0	6,78 ± 0,1	6,78 ± 0,1	6,78 ± 0,1
30	6,21 ± ^{*a}	6,13 ± 0,1 ^{**b}	6,94 ± 0,27 ^{c,d}
60	6,48 ± 0,26 ^a	6,02 ± 0,08 ^{**}	6,97 ± 0,1 ^c
90	6,45 ± 0,06 ^a	6,20 ± 0,13 ^{**b}	6,58 ± 0,24 ^d

Os ensaios foram realizados em quadruplicata e os valores em cada coluna representam a média ± e.p.m. das concentrações. ANOVA twoway, seguido pelo teste de Bonferroni. *Valores significativamente diferentes do Tempo 0 (p<0,01). **Valores significativamente diferentes do controle negativo (p<0,001);

Tabela 15 - Valores de pH para base controle nas diferentes situações de estresse

BASE			
Tempo (dias)	Temperatura		
	Ambiente	Baixa	Alta
0	7,20 ± 0,05	7,20 ± 0,05	7,20 ± 0,05
30	6,73 ± 0,1 ^{***a}	7,21 ± 0,1	7,24 ± 0,06
60	6,33 ± 0,1 ^{***}	6,26 ± 0,11 ^{***a}	6,54 ± 0,1 ^a
90	6,82 ± 0,05 ^{***a}	6,35 ± 0,12 ^{**a}	6,41 ± 0,3 ^{*a}

Os ensaios foram realizados em quadruplicata e os valores em cada coluna representam a média ± e.p.m. das concentrações. ANOVA twoway, seguido pelo teste de Bonferroni. *Valores significativamente diferentes do Tempo 0 (p<0,05); **Valores significativamente diferentes do

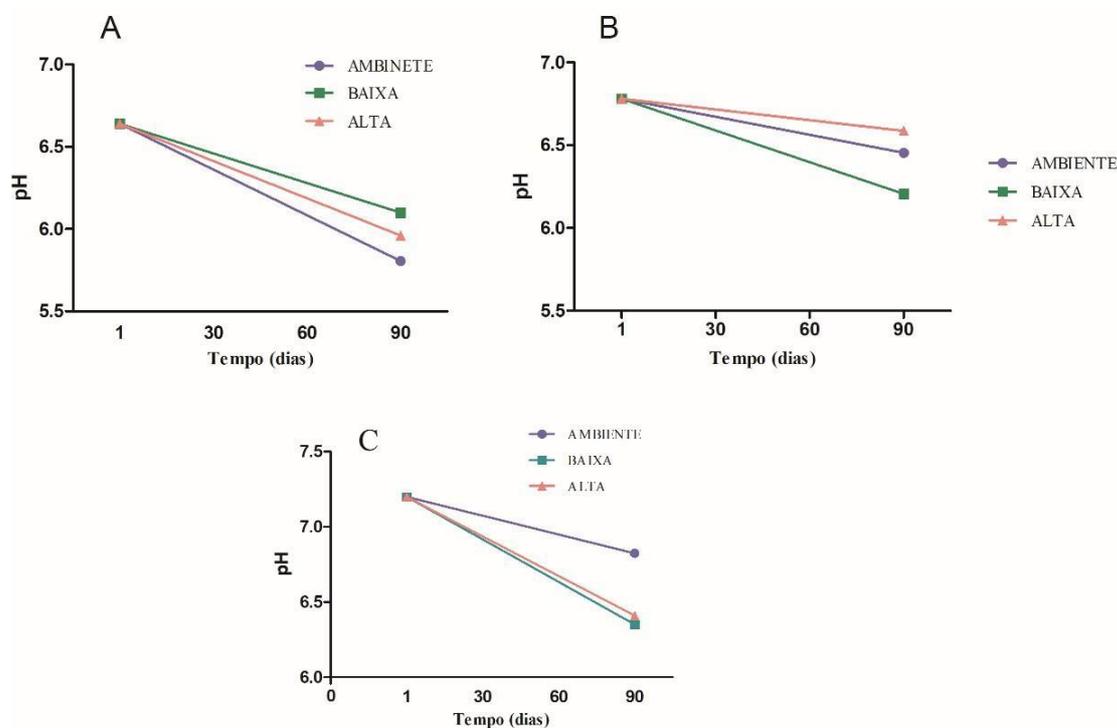
controle negativo ($p < 0,01$); ***Valores significativamente diferentes do controle negativo ($p < 0,001$);

Dentre as análises realizadas em um estudo de estabilidade, o pH é muito importante, pois o produto é estável dentro de determinados valores, uma vez que produtos com baixo ou alto valor de pH estão mais sujeitos à instabilidade química (KELM, 2017; POMBAL, BARATA, & OLIVEIRA, 2010), diminuindo a sua vida útil.

Dentre os fatores que podem interferir no pH, a temperatura elevada pode aumentar a velocidade de reações intrínsecas de 2 a 3 vezes por cada aumento de 10 °C, o que ocorre para a maioria das moléculas, causando instabilidade química no produto (KELM, 2017; POMBAL; BARATA; OLIVEIRA, 2010).

O INFLATIV 6% não apresentou diferença estatística do pH entre as três temperaturas. Enquanto no INFLATIV 12%, essa uniformidade não foi observada. Porém, a formulação se manteve dentro da faixa ácido e neutro desejada (Figura 21). Nesse sentido, INFLATIV nas duas concentrações foi considerado estável.

Figura 21 - Valores do pH inicial e final de INFLATIV 6% (A), INFLATIV 12% (B) e base controle (C)



5.3.2 Densidade

Manter a homogeneidade do produto ao longo da sua vida útil é imprescindível. Essa característica pode ser observada visualmente ou através de maneiras quantitativas, como a determinação da densidade (KELM, 2017).

É possível observar os valores da densidade encontrada em INFLATIV ao longo dos 3 meses nas Tabela 16 e 17, e para base controle na Tabela 18.

Tabela 16 - Valores de densidade para INFLATIV 6% nas diferentes situações de estresse (g/cm³)

INFLATIV 6%			
Tempo (dias)	Temperatura		
	Ambiente	Baixa	Alta
0	0,92 ± 0,01	0,92 ± 0,01 ^b	0,92 ± 0,01 ^c
30	0,80 ± 0,03 [*]	0,85 ± 0,18 ^b	0,93 ± 0,07 ^c
60	0,96 ± 0,02 ^{*a}	0,94 ± 0,06 ^b	0,97 ± 0,07 ^c
90	0,95 ± 0,03 ^{*a}	0,96 ± 0,03 ^b	0,97 ± 0,03 ^c

Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores em cada coluna representam a média ± e.p.m. ANOVA twoway, seguido pelo teste de Bonferroni. *Valores estatisticamente diferentes em relação ao Tempo 0 (P<0,0001). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras (P<0,0001).

Tabela 17 - Valores de densidade relativa para INFLATIV 12% nas diferentes situações de estresse (g/cm³)

INFLATIV 12%			
Tempo (dias)	Temperatura		
	Ambiente	Baixa	Alta
0	0,93 ± 0,02	0,93 ± 0,02 ^a	0,93 ± 0,02 ^c
30	0,96 ^{**}	0,95 ± 0,03 ^a	0,96 ± 0,01 ^{b, c}
60	0,97 ^{**0}	0,96 ± 0,03 ^a	0,95 ± 0,05 ^{b, c}
90	0,97 ^{**}	0,96 ± 0,08 ^a	0,97 ± 0,01 ^{*b}

Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores em cada coluna representam a média ± e.p.m. ANOVA twoway, seguido pelo teste de Bonferroni. *Valores estatisticamente diferentes em relação ao Tempo 0 (p< 0,05); **Valores estatisticamente diferentes em relação ao primeiro dia (p<0,0001). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras (p< 0,05).

Tabela 18 - Valores de densidade relativa para base nas diferentes situações de estresse (g/cm^3)

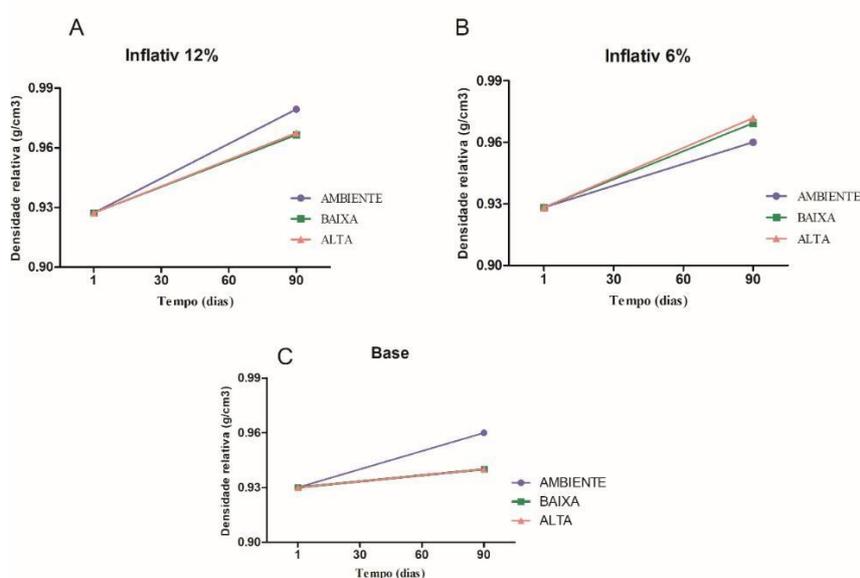
BASE			
Tempo (dias)	Temperatura		
	Ambiente	Baixa	Alta
0	$0,93 \pm 0,02$	$0,93 \pm 0,06$	$0,93 \pm 0,04$
30	$0,94^*$	$0,95 \pm 0,07^{**a}$	$0,94 \pm 0,02^*$
60	$0,95^*$	$0,92 \pm 0,05$	$0,94 \pm 0,02^*$
90	$0,96^*$	$0,94 \pm 0,03^a$	$0,94 \pm 0,03^*$

Os ensaios foram realizados em duplicata e os valores em cada coluna representam a média \pm e.p.m. ANOVA twoway, seguido pelo teste de Bonferroni. *Valores estatisticamente diferentes em relação ao Tempo 0 ($p < 0,0001$); **Valores estatisticamente diferentes em relação ao primeiro dia ($p < 0,05$). Letras iguais representam valores significativamente iguais entre as amostras ($p < 0,05$).

A comparação dos resultados entre as amostras fornece indicações quantitativas se está ocorrendo sedimentação e a taxa em que ocorre, nas determinadas condições de armazenamento (KELM, 2017).

É possível observar que os valores da densidade de INFLATIV não sofreram variações significativas durante o período do teste (Figura 22) considerando uma significância de 5%. Nesse sentido INFLATIV, nas duas concentrações, foi considerado estável.

Figura 22 - Valores de densidade inicial e final de INFLATIV 6% (A), INFLATIV 12% (B) e base controle (C)

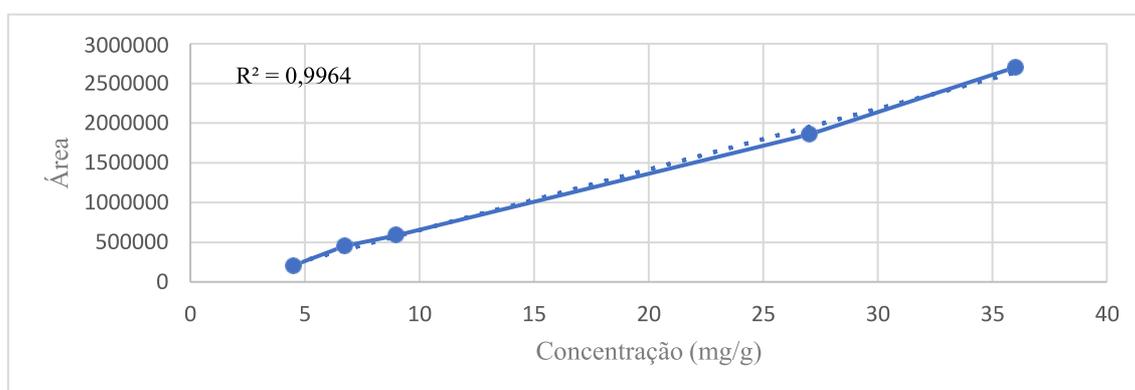


5.3.3 Perfil químico de INFLATIV por CG-EM

Para realizar o perfil de degradação dos compostos em INFLATIV, o fitol foi o composto que melhor apresentou comportamento linear com R^2 satisfatório. Uma curva de calibração utilizando o creme antes do estudo de estabilidade foi construída com as concentrações variando de 1,5% a 12%, apresentando $R^2 = 0,9964$ (Figura 23).

As amostras foram comparadas com o creme antes do processo de estabilidade e os resultados obtidos estão expostos na Tabela 19.

Figura 23 - Gráfico da regressão linear do INFLATIV, expresso em fitol, com concentrações variando de 1,5% a 12%



A análise foi realizada nas seguintes condições: coluna capilar do tipo DB-5MS com 0,25 μ m de espessura do filme, de 30 m de comprimento e 250 μ m de diâmetro interno. O gás de arraste foi hélio com fluxo 1,0 mL/min. Para PHEX, a temperatura do injetor foi de 270 $^{\circ}$ C, forno com temperatura inicial de 50 $^{\circ}$ C até 80 $^{\circ}$ C por 10 minutos (3 $^{\circ}$ C/min), de 80 $^{\circ}$ C até 200 $^{\circ}$ C por 10 minutos (12 $^{\circ}$ C/min), de 200 $^{\circ}$ C a 300 $^{\circ}$ C por 20 minutos (12 $^{\circ}$ C/min) e mais 35 minutos de isoterma final a 300 $^{\circ}$ C, totalizando 75 minutos de corrida. O espectrômetro de massas operou por impacto eletrônico (70 eV), sem fonte iônica.

Tabela 19 - Valores de equivalentes de fitol nas amostras após estudo da estabilidade de 90 dias

Temperatura	INFLATIV 6%		INFLATIV 12%	
	Equivalente na amostra	Degradação	Equivalente na amostra	Degradação
Ambiente	94,44%	5,55%	73,9%	26,1%
Baixa	96,33%	3,66%	76,33%	23,66%
Alta	82,8%	17,2%	56,37%	43,62%

Os ensaios foram realizados em triplicata e os valores em cada coluna representam a média dos valores em porcentagem.

Considerando o fitol como marcador, é possível observar que somente a amostra armazenada em baixa temperatura de INFLATIV 6% por 90 dias se manteve

estável, com degradação < 5%. Porém, a amostra armazenada em temperatura ambiente apresentou degradação igual a 5%, podendo também ser considerada estável.

A instabilidade apresentada pelo INFLATIV 12% ocorre pois, em altas temperaturas, as alterações físico-químicas podem ser aceleradas, enquanto nas baixas pode ocorrer precipitação. Essas alterações podem ocorrer também devido a não conformidade no processo de fabricação e/ou armazenamento (BRASIL, 2004).

6 CONCLUSÃO

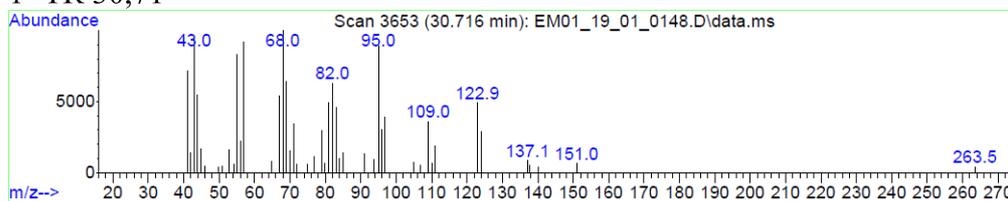
De acordo com os resultados dos testes realizados para o estudo acelerado de estabilidade, é possível concluir que o INFLATIV 6% se mostrou estável quando armazenado em baixa temperatura, permanecendo dentro da faixa permitida de degradação e mantendo suas características físico-químicas.

Dessa forma, este estudo contribui de maneira significativa para o desenvolvimento e registro do INFLATIV 6% junto ao MAPA e encoraja perspectivas futuras para estudos de estabilidade de longa duração e outros que corroborem com esse trabalho.

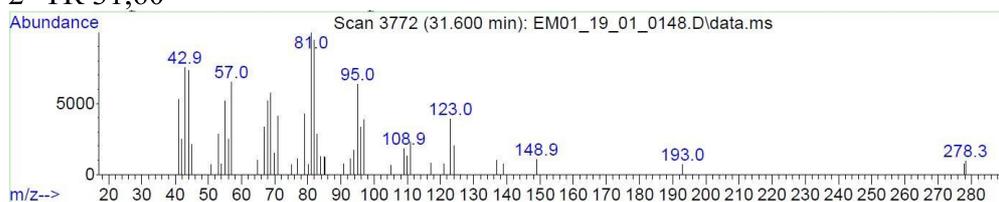
APÊNDICE I

Perfil da quebra dos compostos de PHEX obtido por CG-EM. Os números representam o sinal no cromatograma (Figura 9) seguido dos tempos de retenção (RT) em minutos.

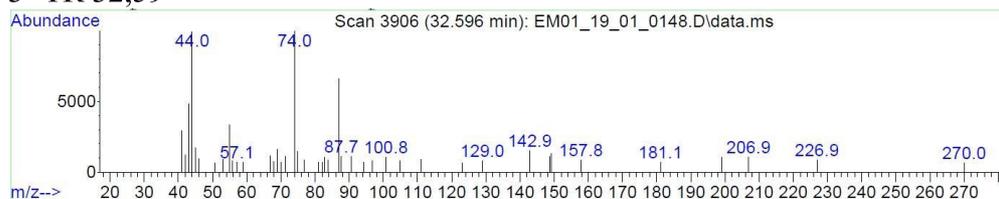
1- TR 30,71



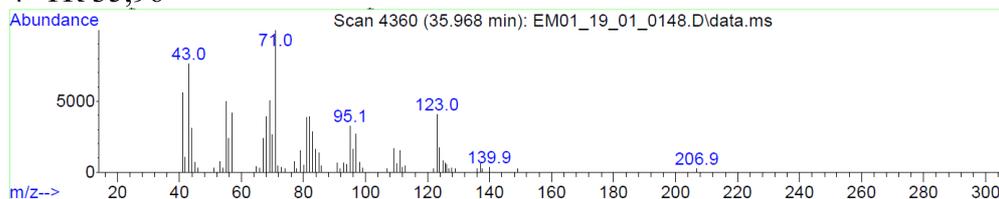
2- TR 31,60



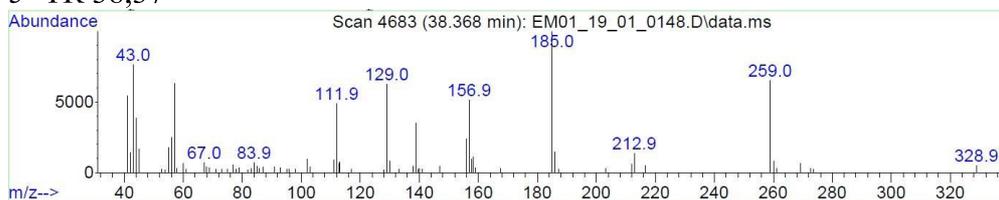
3- TR 32,59



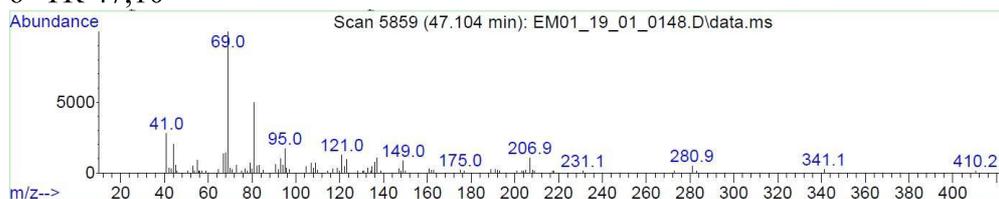
4- TR 35,96



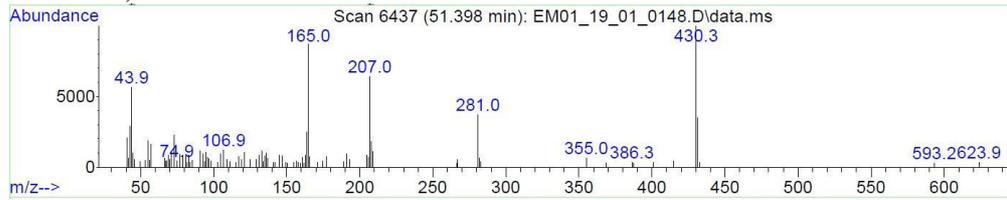
5- TR 38,37



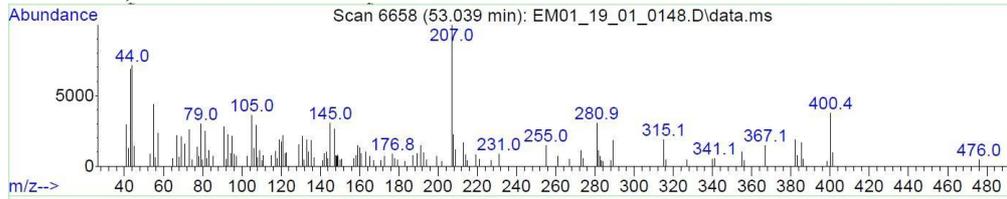
6- TR 47,10



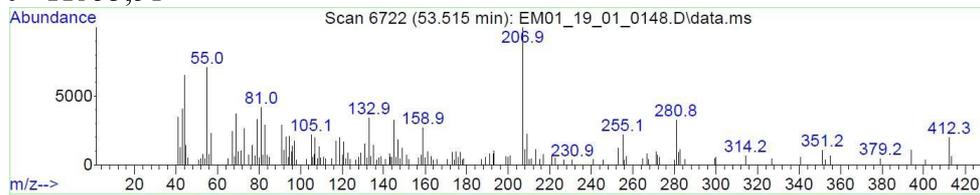
7- TR 51,40



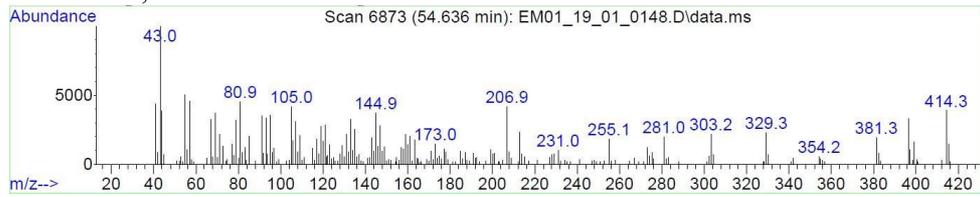
8- TR 53,04



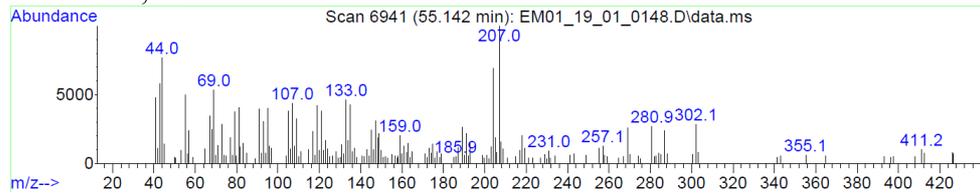
9- TR 53,51



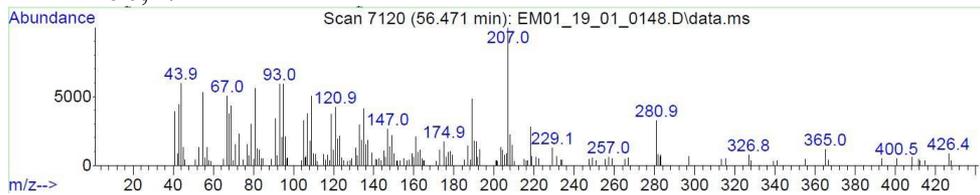
10- TR 54,63



11- TR 55,14

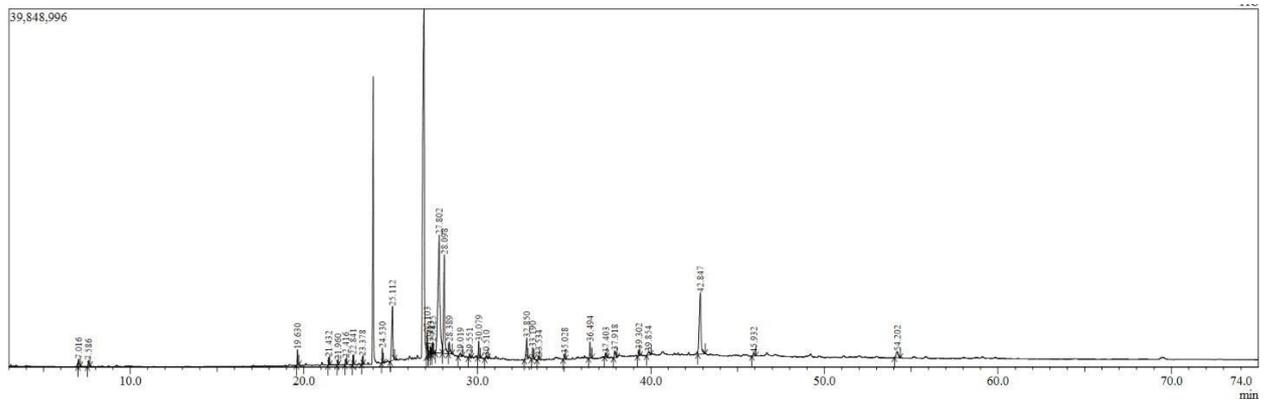


12- TR 56,47



APÊNDICE II

Perfil cromatográfico realizado em cromatografia gasosa do creme INFLATIV



REFERÊNCIAS

- ABBDEWAHAB, S. I. et al. Energy-dispersive X-ray microanalysis of elements ' content and antimicrobial properties of *Pereskia bleo* and *Goniothalamus umbrosus*. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 10, p. 2375–2378, 2009.
- ABDUL-WAHAB, I. R. et al. Anti-nociceptive activity of *Pereskia bleo* Kunth. (Cactaceae) leaves extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, n. 3, p. 741–746, 2012.
- ABINPET, A. B. DA I. DE PRODUTOS PARA ANIMAIS DE E. **Informativo - Mercado pet Brasil 2018**. São Paulo: [s.n.].
- AGOSTINI-COSTA, T. DA S. et al. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 1, p. 234–238, 2012.
- ALMEIDA, M. E. F. DE et al. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, p. 431–439, 2014.
- ALVES, A. C. S. et al. Aspectos botânicos, químicos, farmacológicos e terapêuticos do *Hypericum perforatum* L. **Rev. Bras. Pl. Med.**, p. 593–606, 2014.
- ANVISA, Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Estudos de estabilidade de medicamentos em discussão. Brasília, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/noticias/-/asset_publisher/FXrpx9qY7FbU/content/estudos-de-estabilidade-de-medicamentos-em-discussao/219201>; Acesso em: 23/09/2018
- ARIAS, S.; VÉLIZ-PÉREZ, M. E. Diversidad y distribución de las Cactaceae en Guatemala. **Biodiversidad de Guatemala, Volumen I**, n. Anderson, p. 229–238, 2006.
- ASADI, S. et al. Chemical Composition Analysis, Antioxidant, Antiglycating Activities and Neuroprotective Effects of *S. choloroleuca*, *S. mirzayanii* and *S. santolinifolia* from Iran. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 39, n. 03, p. 615–638, 2011.
- ASHRAF, J. M. et al. Quercetin as a finer substitute to aminoguanidine in the inhibition of glycation products. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 77, p. 188–192, 2015.
- BADHANI, B.; SHARMA, N.; KAKKAR, R. Gallic acid: A versatile antioxidant with promising therapeutic and industrial applications. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27540–27557, 2015.
- BAHUGUNA, A. et al. MTT assay to evaluate the cytotoxic potential of a drug. **Bangladesh Journal of Pharmacology**, v. 12, n. 2, p. 8, 8 abr. 2017.
- BARBOSA, C. C. et al. **Análise da interação entre a Indústria Farmacêutica Veterinária e os Grupos de Pesquisa no contexto de inovação.pdf**. Disponível em: <<https://proceedings.science/zootec/papers/analise-da-interacao-entre-a-industria-farmaceutica-veterinaria-e-os-grupos-de-pesquisa-no-contexto-de-inovacao>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

BARBOSA, C. C.; CARRER, C. DA C.; RUIZ, V. LETTICIE DE A. **Perfil da Indústria Farmacêutica Veterinária no Brasil**. Disponível em: <<https://proceedings.science/zootec/papers/perfil-da-industria-farmaceutica-veterinaria-no-brasil>>. Acesso em: 20 abr. 2019.

BARBOSA, J. H. P. et al. A determinação dos produtos avançados de glicação (AGEs) e de lipoxidação (ALEs) em alimentos e em sistemas biológicos: avanços, desafios e perspectivas. **Química Nova**, v. 39, n. 5, p. 608–620, 2016.

BARBOSA, J. H. P.; DE OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. Produtos da glicação avançada dietéticos e as complicações crônicas do diabetes. **Revista de Nutricao**, v. 22, n. 1, p. 113–124, 2009.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T. E. O papel dos produtos finais da glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v. 52, n. 6, p. 940–950, 2008.

BÁRCENASA, R. T.; YESSONB, C.; HAWKINS, J. A. Cladistics Molecular systematics of the Cactaceae. **Cladistics**, v. 27, p. 470–489, 2011.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: Relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química Nova**, v. 29, n. 1, p. 113–123, 2006.

BARROS, K. N. DE et al. Desenvolvimento de formulação de uso tópico com ação cicatrizante contendo extrato de *Pereskia Aculeata*. **Iniciação Científica CESUMAR**, v. 12, n. 1, p. 29–37, 2010.

BEHNAZ HASSANBAGLOU. Antioxidant activity of different extracts from leaves of *Pereskia bleo* (Cactaceae). **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 6, n. 15, p. 2932–2937, 2012.

BERLINCK, R. G. S. et al. A Química de Produtos Naturais do Brasil do Século XXI. **Química Nova**, v. 40, n. 6, p. 706–710, 2017.

BERTÉ, T. E. et al. Taraxerol as a possible therapeutic agent on memory impairments and Alzheimer's disease: Effects against scopolamine and streptozotocin-induced cognitive dysfunctions. **Steroids**, v. 132, p. 5–11, 1 abr. 2018.

BIRBEN, E. et al. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, jan. 2012.

BONDET, V.; BRAND-WILLIAMS, W.; BERSET, C. Kinetics and mechanisms of antioxidant activity using the DPPH free radical method. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 6, p. 609–615, 1997.

BRASIL, AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - **RDC Nº 26, DE 13 DE MAIO DE 2014**. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos e o registro e a notificação de produtos tradicionais fitoterápicos. Disponível em:

<http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2014/rdc0026_13_05_2014.pdf>
Acesso em: 01 Out. 2018.

BRASIL, **Diário Oficial da União** de 23 de Maio de 2011, Pág. 5, seção 1. Disponível em: < <https://www.jusbrasil.com.br/diarios/26908938/pg-5-secao-1-diario-oficial-da-uniao-Dou-de-23-05-2011/pdfView> >. Acesso em: 23/09/2018

BRASIL. **Farmacopéia Brasileira**. 5º edição ed. Brasília: ANVISA, 2010. v. 1

BRASIL, A. **Guia de estabilidade dos cosméticos**. 1º ed. Brasília: ANVISA, 2004. v. 1

BRASIL, MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO. **INSTRUÇÃO NORMATIVA Nº 15, DE 9 DE MAIO DE 2005**. Regulamento técnico para testes de estabilidade de produtos farmacêuticos de uso veterinário. Disponível em:<
<http://sistemasweb.agricultura.gov.br/sislegis/action/detalhaAto.do?method=visualizarAtoPortalMapa&chave=1775629259>> Acesso em: 25 Set. 2018.

BRAVO FILHO, E. S. et al. Levantamento etnobotânico da família Cactaceae no estado de Sergipe. **Revista Fitos**, v. 12, n. 1, p. 41–53, 2018.

BRUNO, L. DE O.; MARQUES, L. C.; CARDOSO, C. M. Z. Análise das normas vigentes para registro de fitoterápicos veterinários no Brasil. **Science and animal health**, v. 4, n. 3, p. 209–227, 2016.

BURTON, G. J.; JAUNIAUX, E. Oxidative stress. **Best Practice and Research: Clinical Obstetrics and Gynaecology**, v. 25, n. 3, p. 287–299, 2011.

BUTTERWORTH, C. A.; WALLACE, R. S. Molecular Phylogenetics of the Leafy Cactus Genus *Pereskia* (Cactaceae). **Systematic Botany**, v. 30, n. 4, p. 800–808, 2005.

CAPANEMA, L. X. DE L. et al. **Panorama da indústria farmacêutica veterinária**. Rio de Janeiro: [s.n.].

CARNEIRO, A. M. et al. **Cactos do Rio Grande do Sul**. 1º ed. Porto Alegre: Fundação Zoobotânica do Rio Grande do Sul, 2016.

CARNEIRO, F. M. et al. Tendências Dos Estudos Com Plantas Medicinais No Brasil. **Revista Sapiência: sociedade, saberes e práticas educacionais**, v. 3, n. 2, p. 44–75, 2014.

CASTRO, P. A. DE; CHINCHILLA, I. **Estudo de estabilidade para pedido de registro e pós - registro de medicamentos genéricos e similares**, 2005. Disponível em: <<http://www.cpgls.pucgoias.edu.br/8mostra/Artigos/SAUDE E BIOLOGICAS/ESTUDO DE ESTABILIDADE PARA PEDIDO DE REGISTRO E PÓS-REGISTRO DE MEDICAMENTOS GENÉRICOS E SIMILARES.pdf>>

CHIGURUPATI, S. et al. Biomaterials Effects of cerium oxide nanoparticles on the growth of keratinocytes , fi broblasts and vascular endothelial cells in cutaneous wound healing. **Biomaterials**, v. 34, n. 9, p. 2194–2201, 2012.

CNDL. **Mercado de consumo pet.** São Paulo: [s.n.].

DAS, S.; BAKER, A. B. Biomaterials and Nanotherapeutics for Enhancing Skin Wound Healing. **Frontiers in Bioengineering and Biotechnology**, v. 4, p. 82, 31 out. 2016.

DOETSCH, P. W.; CASSADY, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. “Cactus Alkaloids XL. Identification of mescaline and other β -phenethylamines in *Pereskia*, *Pereskopsis* and *Islaya* by use of fluorescamine conjugates. **Journal of Chromatography**, v. 189, p. 79–85, 1980.

DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação Da Atividade Antioxidante Utilizando Sistema B-Caroteno/Ácido Linoléico E Método De Seqüestro De Radicais Dpph•. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 26, n. 2, p. 446–452, 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.

DUQUE, A. P. D. N. et al. In vivo wound healing activity of gels containing *Cecropia pachystachya* leaves. **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 68, n. 1, p. 128–138, 2016.

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

FARAGO, P. V. et al. Análise morfo-anatômica de folhas de *Pereskia grandifolia* Haw., Cactaceae. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 323–327, 2004.

FARSI, D. A. et al. Inhibition of non-enzymatic glycation by silk extracts from a Mexican land race and modern inbred lines of maize (*Zea mays*). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. 1, p. 108–112, jan. 2008.

FERNANDES, M. F. **Potencial antienvhecimento cutanêo da espécie *Cecropia pachystachya*** Trécul. [s.l.] Universidade Federal de Juiz de Fora, 2017.

FERNANDES, M. F. et al. *Cecropia pachystachya* Leaves Present Potential to Be Used as New Ingredient for Antiaging Dermocosmetics. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2019, p. 1–9, 2019.

FERREIRA, D. R. M. DA S. **ESTUDO DO PH DA PELE EM CÃES SAUDÁVEIS E CÃES COM INSUFICIÊNCIA RENAL CRÓNICA.** [s.l.] UNIVERSIDADE TÉCNICA DE LISBOA, 2010.

FIGUEIREDO, B. K.; MARTINI, P. C.; MICHELIN, D. C. Desenvolvimento e estabilidade preliminar de um fitocósmético contendo extrato de chá verde (*Camellia sinensis*) (L.) Kuntze (Theaceae). **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 19, n. 2, p. 770–788, 2014.

FLORA DO BRASIL 2020 em construção, Cactaceae in. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB70>>. Acesso em: 21 Ago. 2018

- FOLIN, O.; CIOCALTEAU, V. Tyrosine and Tryptophane in Proteins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 73, n. 2, p. 627–648, 1927.
- FREITAS, M. DE F. Cactaceae da Área de Proteção Ambiental da Massambaba, Rio de Janeiro, Brasil. **Rodriguésia**, v. 42–44, n. 68–70, p. 67–91, 1990.
- GANDHI, S. G.; MAHAJAN, V.; BEDI, Y. S. Changing trends in biotechnology of secondary metabolism in medicinal and aromatic plants. **Planta**, v. 241, n. 2, p. 303–317, fev. 2015.
- GIMENIS, J. M. **Avaliação da atividade antioxidante, fotoprotetora e anti-glicante dos extratos das folhas e flores de Moringa oleifera**. [s.l.] Faculdade de Ciências e Letras de Assis – UNESP – Universidade Estadual Paulista, 2015.
- GKOGKOLOU, P.; BÖHM, M. Advanced glycation end products. **Dermato-Endocrinology**, v. 4, n. 3, p. 259–270, 2012.
- GOLDIM, J. R. A avaliação ética da investigação científica de novas drogas: a importância da caracterização adequada das fases da pesquisa. **Revista do Hospital de Clínicas de Porto Alegre**, v. 27, n. 1, p. 66–73, 2007.
- GREEN, L. C. et al. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, n. 1, p. 131–138, 1982.
- GUILHON, C. C. et al. Central Antinociceptive and Mechanism of Action of Pereskia bleo Kunth Leaves Crude Extract, Fractions, and Isolated Compounds. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2015, n. September, p. 1–12, 2015.
- HAJDU, Z.; HOHMANN, J. An ethnopharmacological survey of the traditional medicine utilized in the community of Porvenir, Bajo Paraguá Indian Reservation, Bolivia. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 139, n. 3, p. 838–857, 2012.
- HIRATA, L. L.; SATO, M. E. O.; SANTOS, C. A. D. M. Radicais livres e o envelhecimento cutâneo. **Acta Farmaceutica Bonaerense**, v. 23, n. 3, p. 418–424, 2004.
- HUEBSCHMANN, A. G. et al. Diabetes and advanced glycoxidation end products. **Diabetes Care**, v. 29, n. 6, p. 1420–1432, 2006.
- ISAAC, V. L. B. et al. Protocolo para ensaios físico-químicos de estabilidade de fitocosméticos. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 29, n. 1, p. 81–96, 2008.
- ISLAM, M. T. et al. Phytol in a pharma-medico-stance. **Chemico-Biological Interactions**, v. 240, p. 60–73, 5 out. 2015.
- ISLAM, M. T. et al. Phytol: A review of biomedical activities. **Food and Chemical Toxicology**, v. 121, p. 82–94, 1 nov. 2018.
- ISLAM, M. T. Antipyretic effect of phytol, possibly via 5KIR-dependent COX-2 inhibition pathway. **Inflammopharmacology**, p. 1–6, 18 fev. 2019.

- 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, n. 1, p. 86–93, 2012.
- KELM, G. R. SECTION V : Stability and Preservation. In: DAYAN, N. (Ed.). . **Handbook of Formulating Dermal Applications: A Definitive Practical Guide**. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2017. p. 426–462.
- KOWALSKA, M.; ZIOMEK, M.; ZBIKOWSKA, A. Stability of cosmetic emulsion containing different amount of hemp oil. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 37, n. 4, p. 408–416, 2015.
- KOŽÁR, M.; HAMILTON, H.; KOŠČOVÁ, J. Types of Wounds and the Prevalence of Bacterial Contamination of Wounds in the Clinical Practice of Small Animals. **Folia Veterinaria**, v. 62, n. 4, p. 39–47, 2019.
- KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. A review of the antioxidant potential of medicinal plant species. **Food and Bioproducts Processing**, v. 89, n. 3, p. 217–233, 2011.
- KUMAR PASUPULATI, A.; CHITRA, P. S.; REDDY, G. B. Advanced glycation end products mediated cellular and molecular events in the pathology of diabetic nephropathy. **Biomolecular Concepts**, v. 7, n. 5–6, p. 293–299, 2016.
- LEUENBERGER, B. E. *Pereskia*, *Maihuenia*, and *Blossfeldia*—Taxonomic History, Updates, and Notes. **Haseltonia**, v. 14, p. 54–93, 2008.
- LIMA, A. C. **Estudo Taxonômico De Cactaceae Juss . No Estado Da Paraíba , Nordeste Do Brasil**. [s.l.] Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2012.
- LLORET, A. et al. The Effectiveness of Vitamin E Treatment in Alzheimer’s Disease. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 4, p. 879, 18 fev. 2019.
- LORDANI, T. V. A. et al. Therapeutic Effects of Medicinal Plants on Cutaneous Wound Healing in Humans: A Systematic Review. **Mediators of Inflammation**, v. 2018, p. 1–12, 2018.
- LOZANO-GRANDE, M. A. et al. Plant Sources , Extraction Methods, and Uses of Squalene. **International Journal of Agronomy**, v. 2018, 2018.
- LUCAS, R. Semiologia da Pele. In: LUCAS, R. (Ed.). . **Semiologia Veterinária : A arte do diagnóstico**. 2^a ed ed. São Paulo: ROCA LTDA, 2008. v. 1p. 641–676.
- MALEK, S. N. A. et al. Cytotoxic components of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) leaves. **Molecules**, v. 14, n. 5, p. 1713–1724, 2009.
- MARCO, G. J. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 45, p. 594–598, 1968.
- MELO, I. S. V. DE. **Determinação da atividade antiglicante de extratos de plantas sobre Produtos de Glicação Avançada (AGE) in vitro**. [s.l.] Universidade Federal de

Alagoas, 2015.

MENDONÇA, C. C. et al. Emulsões O/A contendo Cetoconazol 2,0%: avaliação da estabilidade acelerada e estudos de liberação in vitro. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v. 30, n. 1, p. 35–46, 2009.

MERINO, F. J. Z. et al. Análise fitoquímica, potencial antioxidante e toxicidade do extrato bruto etanólico e das frações da espécie *Senecio westermanii* Dusén frente à *Artemia salina*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 17, n. 4, p. 1031–1040, 2015.

MORAES, A. DE et al. Listagem, distribuição geográfica e conservação das espécies de Cactaceae no estado do Rio de Janeiro. **Rodriguésia**, v. 56, n. 87, p. 141–162, 2005.

NCUBE, B.; VAN STADEN, J. Tilting plant metabolism for improved metabolite biosynthesis and enhanced human benefit. **Molecules**, v. 20, n. 7, p. 12698–12731, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 2016.

NIKI, E. Role of vitamin E as a lipid-soluble peroxy radical scavenger: in vitro and in vivo evidence. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 66, p. 3–12, 8 jan. 2014.

OH, W. S.; OH, T. H. Mapping of the dog skin based on biophysical measurements. **Veterinary Dermatology**, v. 21, n. 4, p. 367–372, 2010.

OLIVEIRA, D. DE C. DA S. et al. Composição mineral e teor de ácido ascórbico nas folhas de quatro espécies olerícolas não-convencionais. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 472–475, 2013.

ORIQUI, L. R. et al. Definição de Shelf life para produtos químicos - A importância de uma guia de estabilidade específico para o segmento. **Química Nova**, v. 34, n. 10, p. 1869–1874, 2011.

OTHMAN, R. A.; MOGHADASI, M. H. Beyond cholesterol-lowering effects of plant sterols: Clinical and experimental evidence of anti-inflammatory properties. **Nutrition Reviews**, v. 69, n. 7, p. 371–382, 1 jul. 2011.

OTT, C. et al. Role of advanced glycation end products in cellular signaling. **Redox Biology**, v. 2, n. 1, p. 411–429, 2014.

PEREIRA, O. L. et al. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* in Brazil, with comments on the life-cycle of *Uromyces pereskiae*. **Fungal Diversity**, v. 25, n. April, p. 127–140, 2007.

PEREIRA, R. J.; CARDOSO, M. D. G. Metabólitos secundários vegetais e benefícios antioxidantes. **Journal of Biotechnology and Biodiversity**, v. 3, n. November, p. 146–152, 2012.

PIMENTEL, V. et al. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDES**, v. 43, p. 41–89, 2015.

- PINTO, N. D. C. C. et al. *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 12, p. 1780–1785, 2015a.
- PINTO, N. D. C. C. et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330–337, 2015b.
- PINTO, N. DE C. C. et al. Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. **Pharmacologyonline**, v. 3, n. September, p. 63–69, 2012.
- PINTO, N. DE C. C. et al. *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 194, n. October, p. 131–136, 2016.
- PINTO, N. DE C. C.; SCIO, E. The Biological Activities and Chemical Composition of *Pereskia* Species (Cactaceae)-A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 189–195, 2014.
- PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.
- POMBAL, R.; BARATA, P.; OLIVEIRA, R. Estabilidade Dos Medicamentos Manipulados. **Revista da Faculdade de Ciências da Saúde**, v. 7, p. 330–341, 2010.
- POPA, O. et al. Methods for Obtaining and Determination of Squalene from Natural Sources. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 1–16, 2015.
- 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. **Anal Biochem**, v. 269, p. 337–341, 1999.
- QUIROGA, R.; MENESES, L.; BUSSMANN, R. W. Medicinal ethnobotany in Huacareta (Chuquisaca, Bolivia). **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 8, n. 1, p. 29, 2012.
- RAHBAR, S. et al. Novel inhibitors of advanced glycation endproducts (part II). **Molecular Cell Biology Research Communications**, v. 3, n. 6, p. 360–366, 2000.
- RAMAKRISHNA, A.; RAVISHANKAR, G. A. Influence of abiotic stress signals on secondary metabolites in plants. **Plant signaling & behavior**, v. 6, n. 11, p. 1720–31, nov. 2011.
- RISS, T. L. et al. Cell Viability Assays. In: SITTAMPALAM GS, COUSSENS NP, BRIMACOMBE K, ET AL. (Ed.). . **Assay Guidance Manual**. [s.l.] Eli Lilly & Company and the National Center for Advancing Translational Sciences, 2004.
- ROCHA, V. Z. et al. Effects of phytosterols on markers of inflammation: A systematic review and meta-analysis. **Atherosclerosis**, v. 248, p. 76–83, 1 maio 2016.
- RODRIGUES, P. M. et al. Triterpenes from *Pouteria ramiflora* (Mart.) Radlk. Leaves (Sapotaceae). **Food and Chemical Toxicology**, v. 109, p. 1063–1068, 1 nov. 2017.

- ROSA, S. M. DA; SOUZA, L. A. DE. 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.
- SANTOS, M. Estudo de estabilidade de medicamentos. **Revista Acadêmica Oswaldo Cruz**, v. 2, n. 1, p. 1–12, 2015.
- SARTOR, C. F. P. . et al. Estudo da ação cicatrizante das folhas de *Pereskia aculeata*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, p. 149–154, 2010.
- SEBRAE. **Mercado PET e suas oportunidades**. Disponível em: <<https://www.sebraemg.com.br/atendimento/bibliotecadigital/documento/Boletim/Mercado-PET-e-suas-oportunidades>>. Acesso em: 5 fev. 2019.
- SHARIF, K. M. et al. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of antioxidant rich extract from *Pereskia bleo*. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 21, p. 1314–1322, 2015.
- SHARMA, K.; ZAFAR, R. Occurrence of taraxerol and taraxasterol in medicinal plants. **Pharmacognosy Reviews**, v. 9, n. 17, p. 19, 2015.
- SHUANG, R.; RUI, X.; WENFANG, L. Phytosterols and Dementia. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 71, n. 4, p. 347–354, 23 dez. 2016.
- SIES, H. On the history of oxidative stress : Concept and some aspects of current development. **Current Opinion in Toxicology**, v. 7, p. 122–126, 2018.
- SILVA, D. O. et al. Phenological and physicochemical properties of *Pereskia aculeata* during cultivation in south Brazil. **Horticultura Brasileira**, 2018.
- SIM, K. et al. Acute oral toxicity of *Pereskia bleo* and *Pereskia grandifolia* in mice. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 21, p. 67, 2010.
- SIM, K.; SRI NURESTRI, A.; NORHANOM, A. Phenolic content and antioxidant activity of crude and fractionated extracts of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 4, n. 5, p. 193–201, 2010.
- SIMÃO, A. A. et al. Pharmaco-toxic characterization of the aqueous extract from *Pereskia grandifolia* leaves. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 9, n. 7, p. 216–222, 2015.
- SINGH, D. et al. Nitric Oxide radical scavenging assay of bioactive compounds present in methanol extract of *Centella asiatica*. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Science Research**, v. 2, n. 3, p. 42–44, 2012.
- SOUSA, R. M. F. et al. Atividade antioxidante de extratos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) usando métodos espectrofotométricos e voltamétricos in vitro. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 3 SUPPL. 1, p. 448–457, 2014.
- SOUZA, T. C. L. DE. **Perfil De Compostos Fenólicos Extraídos De Folhas De Ora-Pro-Nóbis (Pereskia Aculeata Miller)**. [s.l.] UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS, 2014.

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

SPAGNOL, C. M. et al. Ascorbic Acid in Cosmetic Formulations : Stability , in vitro Release , and Permeation Using a Rapid , Inexpensive , and Simple Method. **Journal of Dispersion Science and Technology**, v. 2691, n. August, p. 1–35, 2016.

SRI NURESTRI, A. M.; SIM, K. S.; NORHANOM, A. W. Phytochemical and cytotoxic investigations of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) leaves. **Journal of Biological Sciences**, v. 9, n. 5, p. 488–493, 2009.

SRI NURESTRI, A.; NORHANOM, A.; SIM, K. Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, n. 23, p. 248, 2010.

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

TESTON, A. P.; NARDINO, D.; PIVATO, L. Envelhecimento cutâneo: Teoria dos radicais livres e tratamento visando a prevenção e o rejuvenescimento. **UNINGÁ Review**, v. 1, p. 71–84, 2010.

TORRES, N. M. P. DE O. et al. A Química dos Produtos Finais de Glicação Avançada. **Revista Virtual de Química**, v. 10, n. 2, p. 375–392, 2018.

UYUB, A. M. et al. In-vitro antibacterial activity and cytotoxicity of selected medicinal plant extracts from Penang Island Malaysia on some pathogenic bacteria . **Journal of Plants, People, and Applied Science**, v. 8, p. 95–106, 2010.

VAN MEERLOO, J.; KASPERS, G. J. L.; CLOOS, J. Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. In: **Methods in Molecular Biology**. Second ed. [s.l.] Springer Science+Business Media, 2011. v. 731p. 237–245.

VASCONCELOS, T. B. DE et al. Radicais Livres e Antioxidantes: Proteção ou Perigo? **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v. 16, n. 3, p. 213–9, 2014.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: Principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323–1338, 2007.

VISTOLI, G. et al. Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): An overview of their mechanisms of formation. **Free Radical Research**, v. 47, n. S1, p. 3–27, 2013.

WINK, M. et al. **Chemotaxonomy Seen from a Phylogenetic Perspective and Evolution of Secondary Metabolism**. [s.l.: s.n.]. v. 40

YADAV, M.; YADAV, A.; YADAV, J. P. In vitro antioxidant activity and total phenolic content of endophytic fungi isolated from *Eugenia jambolana* Lam. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 7, n. S1, p. S256–S261, 2014.

YAO, X. et al. Taraxerol inhibits LPS-induced inflammatory responses through suppression of TAK1 and Akt activation. **International Immunopharmacology**, v. 15, n. 2, p. 316–324, 2013.

YUAN, H. et al. The traditional medicine and modern medicine from natural products. **Molecules**, v. 21, n. 5, 2016.

ZAJAÇ, M. et al. Assessment of a correlation between Canine Atopic Dermatitis Extent and Severity Index (CADESI-03) and selected biophysical skin measures (skin hydration, pH, and erythema intensity) in dogs with naturally occurring atopic dermatitis. **Canadian journal of veterinary research**, v. 79, n. 2, p. 136–40, 2015.

ZANIN, S. M. W. et al. Parâmetros físicos no estudo da estabilidade das emulsões. **Revista Visão Acadêmica**, v. 2, n. 2, p. 47–58, 2001.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N. *Cactaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1633>>. Acesso em: 16 Ago. 2018

ZAREISEDEHIZADEH, S.; TAN, C. H.; KOH, H. L. A review of botanical characteristics, traditional usage, chemical components, pharmacological activities, and safety of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, 2014.

ZHANG, X.; XIONG, H.; LIU, L. Effects of taraxasterol on inflammatory responses in lipopolysaccharide- induced RAW 264.7 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 141, n. 1, p. 206–211, 2012.

ZIMMERMANN, A. M. .; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidante em doenças crônicas : Uma abordagem clínica. **Disc. Scientia. Série: Ciências da Saúde**, v. 9, n. 1, p. 51–68, 2008.

ZUBIN, E. et al. Regenerative therapy for the management of a large skin wound in a dog Key Clinical Message. **Clinical Case Reports**, v. 3, n. 7, p. 598–603, 2015.