

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ
CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM ENGENHARIA
QUÍMICA – NÍVEL DE DOUTORADO

**EXTRAÇÃO E PROCESSAMENTO DE FOLHAS DE *Pereskia aculeata* Miller
EMPREGANDO TECNOLOGIA VERDE**

FERNANDA RENGEL DOS PASSOS

TOLEDO – PR - BRASIL

Outubro de 2022

FERNANDA RENGEL DOS PASSOS

**EXTRAÇÃO E PROCESSAMENTO DE FOLHAS DE *Pereskia aculeata* Miller
EMPREGANDO TECNOLOGIA VERDE**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Doutor em Engenharia Química, área de concentração em **Processos Químicos e Bioquímicos**.

Orientador: Prof. Dr. Edson Antonio da Silva

Coorientadora: Prof^a. Dra. Mônica Lady Fiorese

TOLEDO – PR - BRASIL

Outubro de 2022

Ficha de identificação da obra elaborada através do Formulário de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da Unioeste.

Passos, Fernanda Rengel dos
Extração e processamento de folhas de *Pereskia aculeata*
Miller empregando tecnologia verde / Fernanda Rengel dos
Passos; orientador Edson Antonio da Silva; coorientadora
Mônica Lady Fiorese. -- Toledo, 2022.
112 p.

Tese (Doutorado Campus de Toledo) -- Universidade
Estadual do Oeste do Paraná, Centro de Engenharias e
Ciências Exatas, Programa de Pós-Graduação em Engenharia
Química, 2022.

1. Extrato. 2. Métodos não convencionais. 3. Hidrolisado
proteico. 4. PANC. I. Silva, Edson Antonio da, orient. II.
Fiorese, Mônica Lady, coorient. III. Título.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Ivone e Jairo, por serem meu porto seguro, por acreditarem nos meus sonhos mesmo sem compreendê-los.

Ao meu padrasto, Carlos, por ter sido um incentivador dos meus estudos.

Aos meus irmãos, Carlos Eduardo e Heitor Augusto, vocês são minha motivação para continuar.

Ao meu orientador Profº Dr. Edson por ter acreditado no meu potencial para desenvolver esse projeto e pelo acolhimento ao longo dessa jornada.

À minha coorientadora Profª Dra. Mônica, não tenho palavras suficientes para agradecer essa parceria de mais de oito anos, sou eternamente grata por todo o aprendizado, amizade, dentro e fora do laboratório.

A todos os familiares e amigos que tornam minha vida com muito mais sentido, que são o ombro amigo a quem eu recorro nos momentos de alegria e tristeza. Em especial, Henan, Jéssica, Gabriela, Kellyn, Helóisa, Leonardo e Cristina, a vocês minha eterna admiração e amor.

Aos amigos do laboratório que não pouparam esforços em me ajudar durante o doutorado.

À Capes pelo suporte financeiro.

E a todos aqueles que torcem por mim, mesmo estando longe.

*Devemos acreditar que somos talentosos para alguma coisa,
e que essa coisa, a qualquer custo, deve ser alcançada.*
(Marie Curie)

*Se acender uma lamparina para uma outra pessoa,
iluminará também o seu próprio caminho.*
(Nitiren Daishonin)

*Dedico esta tese ao meu tio,
Ademar Cunha Rengel
(in memoriam)*

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	ii
LISTA DE FIGURAS	vii
LISTA DE TABELAS	viii
RESUMO.....	11
CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO	15
1.2 Objetivos da pesquisa	16
1.2.1 Objetivo Geral	16
1.2.2 Objetivos específicos.....	17
CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	18
2.1 Ora-pro-nóbis (<i>Pereskia aculeata</i> Miller)	18
2.1.1 Composição nutricional e atividades biológicas da ora-pro-nóbis	20
2.2 Extratos vegetais.....	24
2.2.1 Métodos de extração	25
2.2.1.1 Extração assistida por ultrassom (EAU)	25
2.2.1.2 Extração supercrítica (ESC)	26
2.3 Hidrolisados proteicos	30
2.4 Propriedades funcionais e bioatividades	32
2.5 Justificativa.....	37
CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS.....	38
3.1 Matéria-prima	38
3.2 Caracterização da matéria-prima	39
3.2.1 Determinação da umidade	39
3.2.2 Determinação de teor de proteína total	40
3.2.3 Determinação de matéria seca e mineral	40
3.2.4 Determinação de Lipídeos.....	41
3.3 Processo de obtenção do extrato vegetal	42
3.3.1 Extração por <i>Soxhlet</i>	42
3.3.2 Extração assistida por ultrassom (EAU)	42

3.3.3 Extração por maceração dinâmica	43
3.3.4 Extração Supercrítica com CO ₂ (ESC)	44
3.4 Análise da composição dos extratos de OPN	45
3.4.1 Capacidade antioxidante	45
3.4.2 Compostos fenólicos totais (CFT)	45
3.4.3 Determinação da composição química dos extratos de OPN	46
3.4.4 Análise de capacidade antimicrobiana pelo método de difusão em disco	47
3.4.5 Análise estatística	48
3.4 Hidrólise proteica das folhas de OPN.....	48
3.4.1 Determinação do grau de hidrólise (GH).	49
CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	50
4.1 Composição centesimal das folhas de ora-pro-nóbis.....	50
4.2 Extração por <i>Soxhlet</i>	51
4.3 Extração assistida por ultrassom (EAU)	52
4.3.1 Cinética de extração.....	52
4.3.2 Extração Assistida por Ultrassom: Planejamento experimental 2 ³	54
4.3.3 Otimização do rendimento do planejamento experimental da extração assistida por ultrassom.....	64
4.4 Extração supercrítica.....	64
4.4.2 Otimização do rendimento da extração supercrítica	69
4.5 Composição química do extrato das folhas da OPN	70
4.6 Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom.....	74
4.7 Hidrólise proteica das folhas de OPN.....	76
CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES	78
CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	79
CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	80
APÊNDICE	110

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1- - Folhas e flores da ora-pro-nóbis	19
Figura 2.2- Diagrama de fases para uma substância pura.....	27
Figura 3.1- Fluxograma das etapas realizadas para a extração e hidrólise das folhas de OPN	38
Figura 4.1- Cinética de extração das folhas de OPN pelo método de (a) extração assistida por ultrassom (b) maceração dinâmica	53
Figura 4.2- Gráfico da normalidade e dos valores preditos <i>versus</i> observados para o planejamento experimental 2^3 da extração assistida por ultrassom para a variável resposta rendimento.....	56
Figura 4.3- Gráfico (a) Diagrama de Pareto e (b) superfícies de resposta para o planejamento experimental 2^3 para a variável resposta rendimento	58
Figura 4.4- Gráfico da normalidade e dos valores preditos <i>versus</i> observados para o planejamento experimental 2^3 da extração assistida por ultrassom para a variável resposta DPPH.....	62
Figura 4. 5- Diagrama de Pareto para o planejamento experimental 2^3 para a variável resposta DPPH	63
Figura 4.6- Superfícies de resposta para o planejamento experimental 2^3 para a extração assistida por ultrassom para a variável resposta DPPH.....	63
Figura 4.7- Gráfico (a) normalidade (b) valores preditos vs observados referente ao planejamento experimental 2^2 da extração supercrítica com CO ₂ para a variável resposta rendimento.....	67
Figura 4.8- Gráfico (a) Diagrama Pareto (b) Superfície de resposta para o planejamento experimental 2^2 da extração supercrítica com CO ₂ para a variável resposta rendimento.....	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1 - Composição centesimal das folhas de ora-pro-nóbis	21
Tabela 2.2 - Composição mineral das folhas de ora-pro-nóbis.....	21
Tabela 2.3 - Aminoácidos essenciais e não essenciais da folha da ora-pro-nóbis	22
Tabela 2.4 - Compostos bioativos extraídos em diferentes solventes	26
Tabela 2.5 - Temperatura e Pressão para diferentes solventes utilizados em extração crítica	27
Tabela 2.6 - Condições de temperatura e pH para diferentes proteases.....	31
Tabela 2.7 - Aplicações industriais possíveis utilizando a OPN.....	35
Tabela 3.1 - Variáveis e níveis decodificados do Planejamento experimental 2 ³ para a extração assistida por ultrassom das folhas de OPN	43
Tabela 3.2 - Variáveis e níveis decodificados do Planejamento experimental 2 ² para a extração supercrítica com CO ₂ das folhas de OPN.....	44
Tabela 3.3 - Condições experimentais da hidrólise proteica das folhas de OPN.....	49
Tabela 4.1 - Composição centesimal das folhas de ora-pro-nóbis	50
Tabela 4.2 - Rendimentos para as extrações por Soxhlet com diferentes solventes	52
Tabela 4.3 - Rendimento para os ensaios pela técnica de extração assistida por ultrassom das folhas de OPN.....	54
Tabela 4.4 - Análise de variância do planejamento experimental 2 ³ da extração assistida por ultrassom para a variável resposta rendimento.....	55
Tabela 4.10 - Ponto ótimo do rendimento do extrato de OPN para o planejamento experimental da extração supercrítica com CO ₂ e cossolvente etanol.....	70
Tabela 4.11 – Composição química dos extratos de OPN referente aos ensaios 1, 8 e 9 do planejamento experimental 2 ³ obtidos por extração assistida por ultrassom	71
Tabela 4.12 – Determinação de esqualeno, octacosanol e α -tocopherol nos extratos de OPN referente aos ensaios 1, 8 e 9 do planejamento experimental 2 ³ obtidos por extração assistida por ultrassom	71

Tabela 4.13 —Composição química dos extratos de OPN referente aos ensaios 2, 3 e 7 do planejamento experimental 2 ² obtidos por extração supercrítica com CO ₂	72
Tabela 4.14 — Determinação de esqualeno, octacosanol e α -tocopherol nos extratos de OPN referente ao planejamento experimental 2 ² obtidos por extração supercrítica com CO ₂	72
Tabela 4.15 - - Atividade antimicrobiana do extrato das folhas de OPN obtidos por extração assistida por ultrassom	75
Tabela 4.16 - Grau de hidrólise para diferentes condições experimentais	76
Tabela 4.17 - Análise de variância do planejamento experimental 2 ³ da extração assistida por ultrassom para a variável resposta ABTS.....	111
Tabela 4.18 - Análise de variância do planejamento experimental 2 ³ da extração assistida por ultrassom para a variável resposta Compostos fenólicos.....	111
Tabela 4.19 - Análise de variância do planejamento experimental 2 ³ da extração assistida por ultrassom para a variável resposta ABTS.....	111
Tabela 4.20 - Análise de variância do planejamento experimental 2 ³ da extração supercrítica para a variável resposta Compostos fenólicos.....	111
Tabela 4.21 - Análise de variância do planejamento experimental 2 ³ da extração supercrítica para a variável resposta DPPH.....	112

NOMENCLATURA e abreviações

OPN	Ora-pro-nóbis	-
EAU	Extração assistida por ultrassom	-
ESC	Extração supercrítica	-
RMS	Razão massa/solvente	-
RSA	Razão substrato/água	-
RES	Razão enzima/substrato	-
CFT	Compostos fenólicos totais	-
CG-EM	Cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de	-
F_c	Fator de correção	-
P_a	Peso da amostra	(g)
U	Umidade	(%)
V	Volume de ácido gasto	(mL)
GH	Grau de hidrólise	(%)
N	Normalidade	-
PB	Proteína Bruta	(%)

EXTRAÇÃO E PROCESSAMENTO DE FOLHAS DE *Pereskia aculeata* Miller EMPREGANDO TECNOLOGIA VERDE

AUTORA: FERNANDA RENGEL DOS PASSOS

ORIENTADOR: PROF. DR. EDSON ANTONIO DA SILVA

COORIENTADORA: PROF^a DR^a MÔNICA LADY FIORESE

Tese de Doutorado; Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, defesa em 03 de outubro de 2022. 112 p.

RESUMO

A *Pereskia aculeata* Miller, popularmente conhecida por ora-pro-nóbis (OPN), faz parte da família *Cactaceae*, sua folha é utilizada para obtenção de extratos e há relatos do seu potencial antioxidante, anti-inflamatório entre outros. Além disso, as folhas possuem elevado teor de proteínas, o que a torna favorável para aplicação como fonte proteica vegetal. Diante disso, este trabalho tem duas finalidades de investigação, a primeira objetiva realizar a extração das folhas de OPN pelas técnicas de extração assistida por ultrassom (EAU) e extração supercrítica (ESC) com CO₂, avaliando o rendimento, teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante, atividade antimicrobiana e composição química por CG-EM. Para tanto, foi realizado um planejamento experimental 2³ para a extração assistida em ultrassom, utilizando etanol como solvente, avaliando os fatores temperatura, razão massa:solvente (RMS) e potência. A extração supercrítica com CO₂ foi realizada utilizando um planejamento experimental 2², as variáveis analisadas foram temperatura e pressão, também foi realizado um experimento com adição de cossolvente (etanol) no ponto ótimo. O segundo objetivo deste estudo, visa a obtenção de hidrolisados proteicos das folhas de ora-pro-nóbis. Para tanto, foram avaliadas duas enzimas proteolíticas de origem animal na hidrólise, a pepsina e pancreatina, as quais foram empregadas isoladamente e combinadas. Os experimentos foram conduzidos nas

temperaturas de 37 e 45°C, 100 rpm, por 15 e 24 h, sem e com pré-tratamento com extração assistida por ultrassom. Quanto aos resultados, tem-se que a extração assistida por ultrassom, apresentou rendimento máximo de 5,57%, na condição experimental de 70% de potência, 60°C e 1:20 RMS. Esta condição experimental também foi a condição otimizada obtida pelo planejamento experimental. Nesta condição foram obtidos elevados teores de atividade antioxidante e de compostos fenólicos, além de atividade antimicrobiana para a bactéria *Staphylococcus aureus*. Em relação a composição química dos extratos de OPN foram identificados os compostos esqualeno, α -tocoferol e octacosanol, este último, relatado pela primeira vez em extratos de OPN. Já para a extração supercrítica com CO₂ o melhor rendimento foi de 1,39% em 325 bar e 60°C, condição está aplicada na otimização do planejamento experimental. Ao adicionar cossolvente no processo de ESC, 20% de etanol, o rendimento aumentou para 2,38%, elevação de 70% em relação a mesma condição sem adição de cossolvente. A atividade antioxidante e de compostos fenólicos pela técnica de extração supercrítica foi menor quando comparado a extração assistida por ultrassom. A composição química do extrato obtido pela ESC mostrou elevado teor de fitol, além da presença de esqualeno e octacosanol. Em relação aos ensaios de hidrólises enzimática proteica, o maior grau de hidrólise (GH) foi de 8,54% empregando a enzima pepsina, resultado este promissor para uma fonte vegetal hidrolisada. Este ensaio foi realizado sem a aplicação de pré-tratamento das folhas com ultrassom. A partir desta tese, pode-se concluir que os resultados desta pesquisa são promissores e permitem vislumbrar aplicações comerciais, tanto para os extratos quanto para o hidrolisado proteico seja em âmbito industrial farmacêutico, alimentício ou de cosméticos.

Palavras-chaves: extrato, PANC, proteínas, métodos não convencionais, hidrolisado.

EXTRACTION AND PROCESSING *Pereskia aculeata* Miller LEAVES USING GREEN TECHNOLOGY

AUTHOR: FERNANDA RENGEL DOS PASSOS

ADVISOR: PROF. DR. EDSON ANTONIO DA SILVA

CO-ADVISOR: PROF^a DR^a MÔNICA LADY FIORESE

PhD Thesis; Postgraduate Chemical Engineering; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645; CEP: 85903-000 - Toledo - PR, Brasil, presented on October, 03rd 2022. 112p.

ABSTRACT

Pereskia aculeata Miller, popularly known as ora-pro-nóbis (OPN), is part of Cactaceae family, its leaf is used to obtain extracts and there are reports of its anti-inflammatory potential. In addition, the leaves have application protein content, which makes them more favorable as a vegetable protein source. Therefore, this work has two research purposes, the first objective is to perform the lipid extraction of OPN leaves by the techniques of ultrasound-assisted extraction (UAE) and supercritical extraction (SCE) with CO₂, evaluating the yield, content of phenolic compounds, antioxidant activity, antimicrobial activity, and chemical composition by GC-MS. The influence of power, sample to solvent ratio (SSR), and temperature on extraction yield, total phenolic content, and antioxidant activity was evaluated using experimental design. The supercritical extraction with CO₂ was carried out using a 2² experimental design, the variables analyzed were temperature and pressure. It was also performed an experiment with the addition of cosolvent (ethanol) at the optimal point. The second aim of this study is to obtain protein hydrolysates from the leaves of ora-pro-nóbis. For that, two proteolytic enzymes, animal source based, were evaluated in the hydrolysis, pepsin and pancreatin, which were used alone and in combination. The experiments were carried out at temperatures of 37 and 45°C, 100 rpm, for 15 and 24 h, without and with pretreatment with ultrasound-assisted extraction. As for the results, the ultrasound-assisted extraction showed a maximum yield of 5.57%, in the experimental condition of 70% power, 60°C and 1:20 SSR. This experimental condition was also the optimized condition obtained by the experimental design. In this condition, high levels of antioxidant activity and phenolic compounds were obtained, as well as antimicrobial activity for the bacterium *Staphylococcus aureus*. Regarding the chemical composition of OPN extracts, the compounds squalene, α -tocopherol and octacosanol were identified,

this second one being reported for the first time in OPN extracts. As for the supercritical extraction with CO₂, the highest yield was 1.39% at 325 bar and 60°C, a condition that is applied in the optimization of the experimental design. Adding cosolvent in the SCE process, 20% ethanol, the yield increased to 2.38%, an increase of 70% in relation to the same condition without the addition of cosolvent. Antioxidant activity and phenolic compounds by the supercritical extraction technique was lower when compared to ultrasound-assisted extraction. The chemical composition extract obtained by ESC showed a high content of phytol, in addition to the presence of squalene and octacosanol. Regarding the protein enzymatic hydrolysis assays, the highest degree of hydrolysis (DH) was 8,54% using the pepsin enzyme, a promising result for a hydrolyzed plant source. This test was carried out without the application of ultrasound pre-treatment of the leaves. Based on this thesis, it can be concluded that the results of this research are promising and allow us to glimpse commercial applications, both for extracts and protein hydrolysate, whether in the pharmaceutical, food, or cosmetics industry.

Keywords: extract, PANC, proteins, unconventional methods, hydrolysate.

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

Atualmente há uma incessante busca por produtos naturais com características funcionais, antimicrobianas e antioxidantes, visando tanto suprir necessidades nutricionais quanto terapêuticas. Nessa vertente, tem-se a *Pereskia aculeata* Miller, popularmente conhecida por ora-pro-nóbis (OPN), uma planta da família da *Cactaceae*, rica em proteína, sais minerais, fibras e vitamina C, a qual apresenta potencial para aplicação em alimentos ou, ainda, para fins terapêuticos.

A ora-pro-nóbis é considerada uma planta alimentícia não convencional (PANC), sendo utilizada comumente como cerca viva, em paisagismo e, ainda, na alimentação humana, estando entre importantes alimentos regionais brasileiros (BRASIL, 2015). Todas as partes da OPN podem ser aproveitadas, as folhas apresentam alto teor de proteínas e fibras (KAZAMA et al., 2012), ausência de toxicidade (SILVA et al., 2017) e teor significativo de ferro e cálcio (ROCHA et al., 2008; KAZAMA et al., 2012). Ademais, produz flores melíferas e frutos comestíveis, os quais são importantes na alimentação de aves e mamíferos frugívoros, além disso, as folhas e os frutos podem ser incluídos na alimentação humana *in natura* ou em produtos resultantes do seu processamento (QUEIROZ, 2012).

A OPN é uma espécie de fácil propagação através de sementes e estaquia caular, possui crescimento rápido e vigoroso, adapta-se a diversos climas e solos, apresenta baixa incidência de pragas e doenças (QUEIROZ, 2012). No Brasil, a *P. aculeata* Miller pode ser encontrada 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, Santa Catarina, Rio Grande do Sul) (ZAPPI et al., 2018).

Outra possível aplicação da *P. aculeata* Miller é na área médica, expressando potencial anti-inflamatório, cicatrizante, antitumoral e tripanocida (QUEIROZ, 2012). Além disso, há interesse nas folhas da OPN devido ao seu elevado teor de mucilagem, sendo utilizadas, portanto como emolientes (TAKEITI et al., 2009). A mucilagem desperta o interesse industrial pois é uma

possível fonte de hidrocolóides alimentares, podendo-se citar o aglutinante e o agente espessante nos alimentos (AMARAL et al., 2017).

Em virtude do elevado teor de proteínas presente na OPN é possível sua utilização para a obtenção de hidrolisados proteicos, sendo que há relatos de que a hidrólise das folhas disponibiliza peptídeos de baixo peso molecular, ou seja, peptídeos bioativos (TAKEITI et al., 2009). Além disso, Souza et al. (2014) a partir da extração das folhas obtiveram compostos ativos, por exemplo, ácido linoleico, fitol, ácido hexadecanóico entre outros.

Diante do exposto, é notável o grande potencial de aplicação da planta *P. aculeata* Miller em diversos segmentos industriais, desde o setor alimentício até aplicações em âmbito medicinal. Portanto, novos estudos que explorem o potencial desta planta, ainda se fazem necessários, como por exemplo, o emprego de técnicas não convencionais de extração e/ou a aplicação de processos de hidrólise enzimática, processos estes que podem potencializar ou ampliar as aplicações industriais para esta matéria-prima pouco explorada comercialmente. Algumas opções de novas aplicações, são a sua inserção em filmes curativos para utilização médica, devido a capacidade antimicrobiana, anti-inflamatória e cicatrizante que a OPN possui, além de sua atividade antioxidante que pode auxiliar na regeneração da pele. Ou ainda, o uso do extrato de OPN em cosméticos devido sua capacidade antioxidante, e/ou também, sua aplicação na forma de hidrolisado proteico como fonte nutricional proteica para públicos veganos e vegetarianos.

1.2 Objetivos da pesquisa

1.2.1 Objetivo Geral

Esta pesquisa tem por objetivo utilizar as folhas de OPN para obter extratos com compostos bioativos por meio da aplicação de métodos não convencionais de extração e obter hidrolisado proteico a partir da hidrólise enzimática das folhas.

1.2.2 Objetivos específicos

- Analisar a composição centesimal da matéria-prima em termos de lipídeos, proteínas, umidade e material mineral;
- Realizar a extração das folhas de OPN por diferentes métodos: *Soxhlet*, extração por maceração dinâmica, extração assistida por ultrassom e extração supercrítica com CO₂, sem e com co-solvente;
- Realizar a otimização da extração assistida por ultrassom e extração supercrítica com CO₂;
- Verificar o teor de compostos fenólicos, atividade antioxidante e capacidade antimicrobiana para os extratos de OPN;
- Realizar hidrólises proteicas com as enzimas Pancreatina e Pepsina;
- Determinar o teor de proteína solúvel e o grau de hidrólise para os hidrolisados;

CAPÍTULO 2 – REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

Neste capítulo será apresentada a fundamentação teórica e a revisão bibliográfica sobre utilização de plantas alimentícias não-convencionais, especificamente da ora-pro-nóbis. Também será abordado os temas extração e os diferentes métodos de obtenção, hidrólise enzimática, além de pesquisas com extratos e hidrolisados proteicos empregando a OPN.

2.1 Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller)

As plantas alimentícias não convencionais têm se tornado mais conhecidas devido a busca da população por uma alimentação mais saudável. As PANC's são plantas de fácil acesso, baixo custo e altamente nutritivas (ROCHA et al., 2008; SATO et al., 2019).

Dentre as plantas alimentícias não convencionais tem-se a ora-pro-nóbis, *Pereskia aculeata* Miller, que pertence a subfamília Pereskioideae, a qual possui maior número de caracteres primitivos da família *Cactaceae* (DUARTE & HAYASHI, 2005). A OPN é também conhecida *Barbados gooseberry* (TAKEITI et al., 2009; SHARIF et al., 2013).

A ora-pro-nóbis é uma trepadeira arbustiva, possui caule finos, sublenhosos ou lenhosos, podendo atingir até 10 metros de altura. Tem folhas simples, elípticas e largas com poucos espinhos na base, apresenta flores terminais solitárias ou em cimeiras curtas (MAZIA, 2012). Suas folhas têm forma elíptica e simétrica, com cerca de 7 cm de comprimento e 3 cm de largura (DUARTE & HAYASHI, 2005). Além de ter finalidade ornamental a planta pode ser cultivada para a finalidade de produção de mel, uma vez que suas flores são ricas em pólen e néctar. A floração se dá entre os meses de janeiro a abril (FARAGO et al., 2004). A Figura 2.1 apresenta as folhas e flores da OPN.



Figura 2.1- Folhas e flores da ora-pro-nóbis

Fonte: O autor.

As folhas de OPN apresentam em sua composição nutricional elevado teor de proteína e lisina, um aminoácido essencial para a nutrição humana. O teor de proteína bruta varia de 17,4% a 25,4% em massa seca (ALMEIDA-FILHO & CAMBRAIA, 1974). Além do alto teor de proteína, as folhas da ora-pro-nobis (100 gramas por dia), suprem a ingestão diária recomendada para adultos de cálcio, magnésio, zinco, ferro e vitamina C (CONCEIÇÃO, 2013). Devido ao elevado teor proteico a *P. aculeata* Miller também é conhecida usualmente por carne de pobre (KINUPP & LORENZI, 2019).

Os frutos da *P. aculeata* possuem substâncias bioativas, como carotenoides pró-vitamina A, apresentando potencial antioxidante, associado a redução do risco de desenvolvimento de doenças degenerativas (AGOSTINI-COSTA et al., 2012). Agostini-Costa et al. (2014) avaliaram a composição de carotenóides de 10 acessos de *P. aculeata* e obtiveram α -caroteno ($35,1 \mu\text{g g}^{-1}$) e β -caroteno ($39,3 \mu\text{g g}^{-1}$) nos frutos e nas folhas $47 \mu\text{g g}^{-1}$ de β -caroteno, $114,2 \mu\text{g g}^{-1}$ de luteína e níveis de zeaxantina superiores a $5 \mu\text{g g}^{-1}$, resultados que comprovam o potencial bioativo desta planta.

Não obstante, a OPN pode ser aproveitada também na medicina tradicional, pois possui capacidade anti-inflamatória, atuando na recuperação da pele em casos de queimaduras (CONCEIÇÃO, 2013). As folhas de OPN devido a presença da mucilagem, em específico o biopolímero arabinogalactana, podem ser utilizadas em indústrias farmacêuticas e alimentícias. Já que a mucilagem contém características espessantes favoráveis para aplicações como

aditivo em alimentos processados, e em pomadas (MERCÊ et al., 2001). Já os frutos podem ser usados como expectorante e antissifilítico (ROSA & SOUZA, 2003; DUARTE & HAYASHI, 2005; SARTOR et al., 2010).

A produção de ora-pro-nóbis vem ganhando espaço no cenário nacional devido a sua facilidade de produção, rendimento e potencial de aplicação em diversos segmentos. A *P. aculeata* pode ser uma fonte de renda alternativa para ser inserida na agricultura familiar (SOUZA et al., 2016a). À exemplo, tem-se a empresa Proteios, a qual produz OPN a partir da agricultura familiar na região de Palmeira/PR, de modo orgânico, sem uso de agrotóxicos ou aditivos químicos. Os produtos atualmente consistem em chás, cápsulas com OPN em pó, OPN em pó micronizado, fibra de OPN, extrato de ora-pro-nóbis nas versões aquoso e seco, para utilização em alimentos e bebidas, além dos extratos glicerinado e glicólico para uso em fármacos e cosméticos.

Além do surgimento de novas empresas, há também parcerias entre projetos de pesquisa em universidade e agricultores. Em Minas Gerais, por meio da Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais (Epamig) tem-se a realização de estudos com OPN, utilizando o sistema de plantio superadensado com colheitas sucessivas de folhas e ramos novos. O uso desta técnica permite o aumento da produção de biomassa e de proteína por área e por tempo. A densidade do plantio é de 10 plantas/m² e oito colheitas anuais, resultando em 5759 kg/ha/ano de proteínas nas folhas, sendo estes valores superiores a outras plantas que são fontes de proteína para alimentação humana e animal. A busca por aprimoramento no plantio é constante, inclusive há pesquisa com diferentes genótipos, incluindo um sem espinhos, visando facilitar a colheita, assim como o uso direto *in natura* ou seco para alimentação animal (EPAMIG, 2021).

2.1.1 Composição nutricional e atividades biológicas da ora-pro-nóbis

O uso de ora-pro-nóbis devido a sua composição nutricional é associado a prevenção e tratamento de diversas enfermidades, por exemplo, tratar feridas e inflamações da pele, deficiência de ferro e vitamina A. As PANC costumam apresentar teores maiores de minerais e proteínas, além de fibras e compostos com função antioxidante do que plantas domesticadas (KINUPP & BARROS,

2008). Destaca-se na constituição das folhas de ora-pro-nóbis a presença de proteínas e fibras. A composição centesimal, mineral e de aminoácidos das folhas de ora-pro-nóbis são expostas nas Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3.

Tabela 2.1 - Composição centesimal das folhas de ora-pro-nóbis

	Maciel et al. (2021)¹	Takeiti et al. (2009)²	Rodrigues (2016)³	Almeida et al. (2014)⁴
Umidade	6,87±0,03	89,05±0,2	4,83±0,14	12,46±0,47
Proteína	21,81±0,10	28,49±0,4 (3,1)	15,71±0,24	28,99±0,59
Lipídeos	7,81±0,30	4,19±0,3	3,57±0,23	5,07±0,15
Cinzas	11,90±0,11	16,19±0,1	17,25±0,07	14,81±0,18
Fibra solúvel	-	5,2	7,14±1,49	2,43±0,38
Fibra insolúvel	-	33,9	43,40±0,95	19,17±0,82
Carboidrato	51,61±0,44	-	8,49±0,97	29,53±1,28

¹ resultados em % em base seca. ² resultados em g 100 g⁻¹ em base seca, exceto para água.

³ resultados em g (%) em base seca. ⁴ resultados em g 100 g⁻¹ em base seca.

Tabela 2.2- Composição mineral das folhas de ora-pro-nóbis

Minerais	Takeiti et al. (2009)¹	Rodrigues (2016)²	Almeida et al. (2014)²
Potássio	1632	2683,00±0,10	3910,00±416,05
Cálcio	3420	3883,00±0,03	1346,67±30,55
Magnésio	1900	2710,00±0,20	586,67±5,77
Enxofre	-	-	583,33±25,17
Fósforo	156	166,00±0,07	320,00±1,00
Manganês	46,4	-	43,48±0,37
Ferro	14,2	31,96±1,49	20,56±0,22
Zinco	26,7	-	7,30±0,06
Cobre	1,4	-	1,24±0,02

¹ resultados em mg 100 g⁻¹ em base úmida. ² resultados em mg 100 g⁻¹ em base seca.

Pelas Tabelas 2.1, 2.2 e 2.3 nota-se o potencial de empregabilidade das folhas de OPN devido a sua rica composição nutricional. O teor de proteína encontrado nas folhas de OPN são maiores do que em fontes vegetais comuns, à exemplo, milho comum (7,6-10% p/p), feijão (18-20% p/p), espinafre (2,2% p/p), couve (1,6% p/p) e alface (1,3% p/p) (ALMEIDA & CAMBRAIA, 1974; MERCÊ et al., 2001).

Tabela 2.3- Aminoácidos essenciais e não essenciais da folha da ora-pro-nóbis

Aminoácidos Essenciais (g.100 g⁻¹)	Takeiti et al. (2009)	Albuquerque et al. (1991)	Dayrell (1977)	FAO/ WHO (1990)
Histidina	0,59±0,01	2,62	1,53	1,9
Arginina	1,44±0,02	8,4	5,58	
Treonina	1,00±0,01	5,31	4,34	3,4
Valina	1,28±0,01	6,9	5,83	3,5
Metionina	0,23±0,01	2,1	1,46	
Isoleucina	1,07±0,01	5,6	4,45	2,8
Leucina	2,00±0,02	9,26	8,75	6,6
Fenilalanina	1,27±0,01	5,89	6,33	
Lisina	1,43±0,05	6,24	5,44	5,8
Triptofano	5,52±0,19	2,16	2,20	1,1
Σ Aminoácidos essenciais	15,83	54,48	45,91	32,8
Aminoácidos não essenciais (g.100 g⁻¹)				
Ácido Aspartico	1,71±0,22	9,93	9,46	
ÁcidAlburo Glutâmico	2,67±0,03	10,13	11,53	
Serina	1,00±0,01	5,86	4,3	
Glicina	1,31±0,01	6,7	8,89	
Alanina	1,36±0,01	7,94	5,94	
Prolina	1,11±0,01	5,03	4,2	
Tirosina	1,21±0,03	4,86	4,83	
Cisteina	0,35±0,02		1,35	
Σ Aminoácidos não essenciais	11,13	50,45	50,5	

A qualidade da proteína está relacionada com seus aminoácidos, sendo que nas folhas de *P. aculeata* há a presença de todos os aminoácidos essenciais. Além de possuir uma composição bem equilibrada, as folhas têm elevado teor de lisina, sendo que esta, em geral, é deficiente em cereais (PINTO & SCIO, 2014). As folhas de OPN ao serem associadas em dietas de crianças mostraram combater a desnutrição infantil (CARDOSO et al., 2017).

A OPN também possui polissacarídeos, por exemplo, arabinogalactana (MERCÊ et al., 2001a) e galactomananos (MERCÊ et al., 2001b) aliado a isso, sua alta porcentagem de proteínas quando complexado a íons metálicos essenciais permitem amplo uso em indústrias de alimentos e fármacos (MERCÊ et al. 2001a), demonstrando assim sua viabilidade e perfil de adesão celular, facilitando o emprego na forma de curativo biocompatível (LUCYSZYN et al., 2016).

Existem diversas aplicações comerciais para os heterossacarídeos oriundos da OPN, por exemplo, aditivos alimentícios e produtos farmacêuticos (MERCÊ et al., 2001a), em cremes contra envelhecimento cutâneo (GARCIA et al., 2011), emulsificante, estabilizante em solução aquosa (MARTIN et al., 2017), além de composição de cápsulas (SANTOS et al., 2014).

Há relatos na literatura do potencial antioxidante, antimicrobiano e antifúngico da *P. aculeata*. Queiroz et al. (2015) notaram que a tendência do aumento da atividade antioxidante desta planta está relacionada com a maior disponibilidade de luz nas folhas.

Souza et al. (2016) em seu estudo verificam a atividade antioxidante, conteúdo fenólico, além de atividade antimicrobiana e antifúngica de três extratos de folhas de *Pereskia aculeata*, obtidos utilizando os solventes éter de petróleo, clorofórmio e metanol. Os autores verificaram que o extrato obtido com clorofórmio apresentou elevado teor de atividade antioxidante, capaz de reduzir a concentração de DPPH em 50% (81,09 mg mL⁻¹). Enquanto o extrato metanólico apresentou o maior teor de polifenóis 15,04 mg_{GAE} g⁻¹. Houve também a inibição no crescimento de *Aspergillus versicolor* para o extrato obtido com metanol. Já o extrato de éter de petróleo apresentou atividade antimicrobiana contra *Escherichia coli* e inibição do crescimento do fungo

Aspergillus versicolor. O extrato elaborado a partir de clorofórmio teve atividade inibitória contra as cepas *Bacillus cereus* e *Staphylococcus aureus*.

2.2 Extratos vegetais

A extração é a principal técnica utilizada para separação, caracterização e obtenção de compostos bioativos (STEIGNY et al., 2007). A obtenção de extratos vegetais pode ocorrer por diferentes métodos de extração visando isolar componentes químicos. O método de extração tem influência direta nos constituintes recuperados, o que por sua vez afeta a capacidade antioxidante de cada tipo de extrato (KOBAYASHI et al., 2007; HAYOUNI et al., 2007).

Os óleos vegetais e gorduras, em geral, são extraídos por meio de prensagem direta, extração mecânica ou extração com solventes (SANTOS, 2014; MILHOMEN-PAIXÃO et al., 2017).

A extração pelo método *Soxhlet* empregando solvente aquecido para obter o extrato é uma técnica simples, porém necessita de grandes volumes de solvente, além de tempo de extração, e ainda, podem apresentar baixo rendimento de compostos bioativos e baixa seletividade (DAWIDOWICZ et al., 2008; ORMEÑO, 2011; IBÁÑEZ et al., 2012). A extração por *Soxhlet* é muito utilizada para fins de comparação com outros métodos de extração não convencionais.

Os métodos de extração mais utilizados para a extração de OPN encontrados na literatura são *Soxhlet* (TORRES et al., 2021), maceração (SOUZA et al., 2016), maceração dinâmica (GARCIA et al., 2019; CRUZ et al., 2021), extração por líquido pressurizado e extração supercrítica (TORRES et al., 2021).

Deste modo, busca-se a implementação de técnicas mais eficientes de extração, diferentes das tradicionais, como a extração assistida por ultrassom e a supercrítica que são consideradas técnicas mais ambientalmente sustentáveis.

2.2.1 Métodos de extração

2.2.1.1 Extração assistida por ultrassom (EAU)

O ultrassom é um tipo de onda sonora que varia de 20 kHz a 100 MHz, estando além da audição humana. O mecanismo de funcionamento do ultrassom consiste no processo de cavitação, ou seja, através da produção, crescimento e colapso de bolhas (AZMIR et al., 2013). Comumente, é utilizado a frequência de 20 kHz e potência variando de 100 a 800 Watts, pois, há relatos que nesta frequência ocorre a extração máxima do conteúdo vegetal (SHIRSATH et al., 2012).

Na extração sólido-líquido, o ultrassom melhora a transferência de massa, uma vez que, induz uma maior penetração do solvente nos materiais celulares. O ultrassom pode romper as paredes celulares, facilitando a penetração do solvente e liberando o conteúdo a ser extraído, ocasionando um aumento no rendimento da extração, e ainda diminui o consumo de solventes (WANG & WELLER, 2006). Além disso, o processo de extração por este método pode ser realizado em temperaturas mais baixas, minimizando possíveis danos térmicos aos extratos (MOHAMMADPOUR et al., 2019).

Dentre os parâmetros que influenciam no rendimento do processo de extração, destaca-se: tamanho da partícula, tipo e composição do solvente, proporção sólido/solvente, temperatura, pH, pressão e tempo de extração (MOHAMMADPOUR et al., 2019).

A técnica de extração por ultrassom tem potencial de aplicação industrial reconhecido, em especial, para obtenção de compostos bioativos de plantas, por exemplo, polifenóis, antocianinas, compostos aromáticos, polissacarídeos e compostos funcionais (VILKHU et al., 2008). Na Tabela 2.4 é explanado quais compostos são extraídos com diferentes solventes.

Além da escolha do solvente, outro parâmetro relevante ao processo de extração é o tempo de sonicação. Este fator depende do tipo de material utilizado, da estrutura da parede celular, resistência à transferência de massa, além da taxa de penetração do solvente no material vegetal. Em geral, os tempos utilizados para a extração assistida por ultrassom (EAU) variam de 120 segundos a 1 hora, tempo este considerado bastante inferior aos empregados nos

processos convencionais. Já as temperaturas podem variar de 20 a 80 °C, sendo mais comum entre 30 e 40 °C (SHIRSATH et al., 2012).

Tabela 2.4- Compostos bioativos extraídos em diferentes solventes

	Solventes						
	Água	Etanol	Metanol	Clorofórmio	Diclorometano	Éter	Acetona
Compostos bioativos	Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenóides	Terpenóides	Alcalóides	Flavonóides
	Taninos	Polifenóis	Terpenóides	Flavonóides		Terpenóides	
	Saponinas	Flavonóis	Saponinas				
	Terpenóides	Terpenóides	Taninos				
		Alcalóides	Flavonas				
			Polifenóis				

Fonte: Adaptado de Cowan (1999) e Azmir et al. (2013)

Na literatura não foram encontrados estudos, até o momento, da extração de folhas de ora-pro-nóbis por ultrassom, portanto, a presente pesquisa tem caráter inovador.

2.2.1.2 Extração supercrítica (ESC)

A extração supercrítica consiste no poder de solvatação de fluidos acima da sua temperatura e pressão crítica (SHARIF et al., 2014). Na Figura 2.2 está demonstrado o diagrama de fases, em que é possível notar a temperatura e pressão crítica.

O uso de fluido supercrítico se faz interessante, pois apresenta comportamento de gás e de líquido. Na região de fluido supercrítico, pequenas alterações na temperatura e pressão geram efeitos significativos na densidade, de modo que, a solubilidade do soluto no solvente é influenciada por esse parâmetro (MENDES et al., 2003).

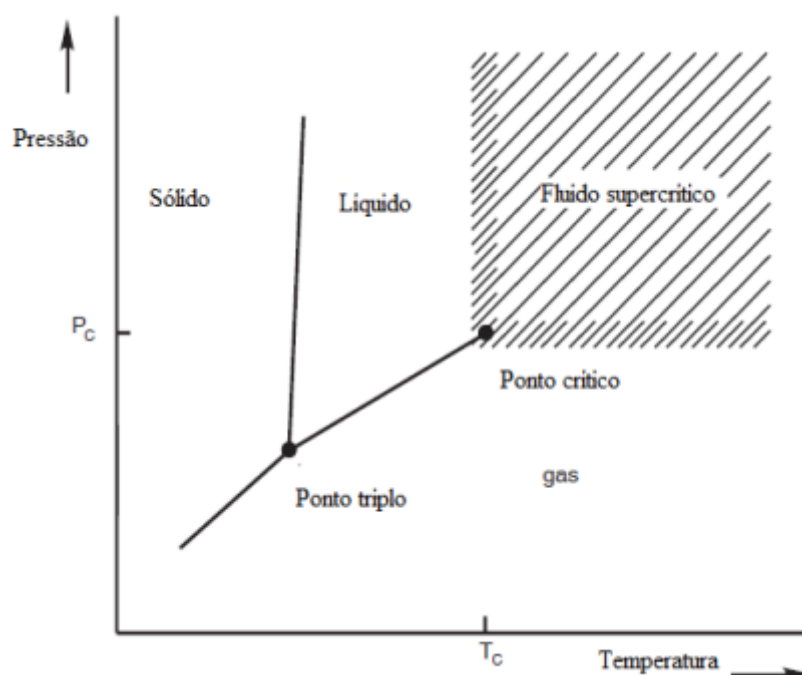


Figura 2.2- Diagrama de fases para uma substância pura

Fonte: Adaptado de Brunner et al. (1994) e Salvador (2014)

Por meio da extração supercrítica é possível obter uma significativa, ou até mesmo, completa extração, devido a penetração dos solventes em materiais sólidos porosos, sendo forçados constantemente a passar pela amostra (LANG & WAI, 2001). É exposto na Tabela 2.5 as temperaturas e pressões críticas para diferentes solventes.

Tabela 2.5- Temperatura e Pressão para diferentes solventes utilizados em extração supercrítica

Solvente	Temperatura Crítica - Tc (°C)	Pressão Crítica - Pc (bar)
Etano	32,3	48,7
Água	374,3	221,2
Etileno	9,4	50,4
Propileno	91,9	46,0
Propano	96,8	42,5
CO ₂	31,1	73,8

Fonte: Adaptado de Cavalcanti (2012) e Klein (2016).

O dióxido de carbono é considerado um solvente ideal para a utilização no sistema de extração supercrítico. Sua temperatura crítica (31,1°C) é próxima a temperatura ambiente, além de baixa pressão (73,8 bar), neste tipo de sistema

é usual ser empregado pressões que variam de 100 a 450 bar (TEMELLI & GÜÇLÜ- ÜSTÜNDAG, 2005). A temperatura crítica baixa do dióxido de carbono tem como benefício a redução da degradação de compostos sensíveis a elevadas temperaturas, por exemplo, proteínas e antioxidantes (SPARKS et al., 2006).

Outra vantagem da utilização do dióxido de carbono supercrítico (CO_2 - SC) é não ser tóxico e inflamável, ter baixo custo, ser reutilizável, além de melhorar a qualidade do produto (MENDES et al., 2003; RIERA et al., 2004). Ainda, não é prejudicial para o meio ambiente e para produção de alimentos (ZHAO, 1987).

Em indústrias de fármacos e cosméticos, as quais requerem alto teor de pureza, o uso de CO_2 -SC é vantajoso (VASAPOLLO et al., 2004), uma vez que não há resíduos do solvente no produto, pois o CO_2 -SC é eliminado do produto após uma etapa de despressurização (ATTARD et al., 2018).

Para obter-se uma boa eficiência nesta técnica é necessário atentar-se as escolhas das seguintes variáveis: temperatura, pressão, tamanho de partícula, umidade da amostra, tempo de extração, vazão de CO_2 , além do fator solvente / alimentação (TEMELLI & GÜÇLÜ-ÜSTÜNDAG, 2005; IBAÑEZ et al., 2012). Este modo de extração apresenta como vantagens, redução do tempo de extração, facilidade de ampliação de escala, podendo ser utilizado de miligramas de amostra para toneladas em uma indústria, e ainda, utiliza pouca quantidade de solvente (LANG & WAI, 2001).

A única desvantagem do dióxido de carbono é sua baixa polaridade, o que o torna ideal para extração de compostos apolares, lipídios, por exemplo, porém é inadequado para grande parte dos produtos farmacêuticos (AZMIR et al., 2013). Este limitante é facilmente resolvido adicionando um cossolvente, etanol, por exemplo (SIHVONEN et al., 1999).

A adição de um cossolvente volátil aplicado em pequenas quantidades junto com o fluído supercrítico resulta num aumento da solubilidade do soluto, este efeito é chamado de efeito “*entrainer*” (QUEIROZ; 2016). Além disso, há um aumento no rendimento e seletividade de compostos de matrizes vegetais (QUEIROZ; 2016).

Ademais, outra vantagem para o uso do CO₂ supercrítico adicionado de cossolvente é a otimização do processo, pois a eficiência da extração é aumentada devido ao aumento da solubilidade oriundo das interações química ou físicas entre soluto e solvente. O aumento da eficiência pode ser atribuído também com o transporte de soluto dos poros internos para a superfície por meio do inchaço da matriz sólida (SANTOS et al., 2017).

Na busca realizada na literatura, foram encontrados apenas dois estudos envolvendo a técnica de extração por fluido supercrítico, utilizando folhas de ora pro nobis. Torres et al. (2021) avaliaram em seu estudo três diferentes métodos de extração: *Soxhlet*, extração por fluido supercrítico (CO₂) e extração por líquido pressurizado. Na extração supercrítica, as condições experimentais adotadas foram: 40, 50 e 60 °C, a vazão de CO₂ foi mantida em 1,2 kg h⁻¹, a pressão utilizada foi de 25 MPa e o tempo de extração foi 120 min. O rendimento para a temperatura de 40, 50 e 60°C foi de 1,78, 1,69 e 1,68%, respectivamente. Os extratos de OPN tiveram sua composição avaliada em termos de componentes. Foi verificada a presença de distintos compostos, entre eles: vitamina E, fitol, campesterol, além de terem reportado pela primeira vez a presença de fucosterol e lupeol nesse tipo de extrato.

Torres et al. (2022) avaliaram também a extração de OPN empregando métodos benéficos ambientalmente. Os autores avaliaram extrações sequenciais com métodos de alta pressão, sendo eles: extração supercrítica com CO₂, seguido de extração com líquido expandido à gás e extração de líquido pressurizado e, por fim, extração com água subcrítica. Na etapa de extração supercrítica o rendimento foi de 1,87% na condição experimental de 25 MPa, 40°C, fluxo de CO₂ em 5 L min⁻¹ e 270 min. Ao final de todos os processos, a extração com água subcrítica teve rendimento de 65,28% quando realizada a 185°C.

Apesar de existirem dois estudos em que foi empregado a extração por fluido supercrítico em folhas de OPN, verifica-se que ainda, há potencial exploratório para esta técnica, como por exemplo o uso de cossolvente no processo, sendo este o diferencial que esta pesquisa busca estudar.

2.3 Hidrolisados proteicos

Atualmente, tem-se aumentado a busca por fontes proteicas naturais, as quais possam ser utilizadas no desenvolvimento de alimentos funcionais com alto valor nutritivo e que promova benefícios para a saúde do consumidor (COTABARREN et al., 2019).

O processo de hidrólise enzimática de proteínas vegetais e animais, é um dos preferidos para obtenção de hidrolisados com peptídeos específicos, sendo que estes são preservados, quando comparados com a hidrólise química, devido à sua alta seletividade e condições amenas de processo (COELHO et al., 2019).

A hidrólise proteica ocorre por meio do processo de clivagem da porção proteica em meio aquoso em fragmentos menores, de diversos tamanhos, resultando em uma porção solúvel rica em proteína, peptídeos e eventualmente aminoácidos livres e outra parte que é constituída pelo material não hidrolisado (ADLER-NISSEN, 1986; ALBUQUERQUE, 2003; PASUPULETI & BRAUN, 2010).

A hidrólise proteica, proporciona um produto com maior digestibilidade, pois, ocorre uma pré-digestão da proteína, facilitando assim a sua absorção por conter fragmentos em tamanhos menores (SILVA et al., 2017b). A qualidade dos peptídeos encontrados no produto depende de inúmeros fatores, entre eles, destaca-se: a fonte de proteína, pré-tratamento, tipo e quantidade de enzima utilizada, concentração de substrato, grau de hidrólise, temperatura e pH (YU et al., 2014).

Para que o processo de obtenção do hidrolisado proteico seja eficiente é necessário escolher a enzima adequada. As enzimas empregadas para realizar a quebra de proteínas são proteases, peptidases ou proteinases, são pertencentes ao grupo das hidrolases que catalisam e realizam a clivagem hidroliticamente as ligações peptídicas da molécula de proteína (NELSON & COX, 2002).

Nesta pesquisa foram utilizadas as proteases, que pertencem ao grupo das hidrolases, ou seja, catalisam a reação de hidrólise das ligações peptídicas das proteínas, transferindo assim os constituintes da matéria-prima para a água (WHITAKER, 1994; ELLAIAH, 2002).

As enzimas podem ser obtidas de diferentes fontes, como plantas, animais ou microrganismos. As de origem microbiana produzidas por processos biotecnológicos, são as mais promissoras para aplicação em escala industrial, por serem enzimas com maior especificidade frente as outras fontes, estas representam 60% das vendas do mercado mundial (BEYOND & BOND, 2001; SINGH et al., 2001). Na Tabela 2.6 são apresentadas algumas condições operacionais para algumas enzimas proteolíticas.

Tabela 2.6- Condições de temperatura e pH para proteases de diferentes fontes.

Enzima	pH	Temperatura (°C)
	Máxima atividade proteolítica	Máxima atividade proteolítica
Alcalase	6,5 - 8,5	55 – 70
Neutrase 0,5L	5,5 – 7,5	45 – 55
Protamex	5,5 – 7,5	35 – 60
Corolase 7089	5 – 7,5	<60
Corolase PN-L	5 – 8	<50
Corolase LAP	6 – 9	<70
Papaina	5 – 7	65 – 80
Bromelina	3 – 9	50 – 60
Pepsina	1,5 - 2,5	35 – 50
Novo ProD	6 – 9	50 – 60

Fonte: Adaptado de Vermelho et al. (2008)

Durante a coleta do referencial bibliográfico para o desenvolvimento deste estudo, foi encontrado apenas o artigo de Takeiti et al. (2009) que realiza a hidrólise proteica a partir das folhas de *Pereskia aculeata*. Além desse autor, Marques et al. (2021) apresentou um estudo sobre a hidrólise das folhas de OPN em um congresso. No entanto, informações relevantes foram omitidas neste trabalho.

Takeiti et al. (2009), empregaram em seu estudo duas enzimas de origem suína, a pepsina e a pancreatina. As condições escolhidas para a utilização destas foi de 37°C, sem ajuste de pH para a enzima pepsina, enquanto o pH foi ajustado para 7 para a posterior adição da pancreatina.

Marques et al. (2021) avaliaram a relação entre a hidrólise proteica das folhas de OPN e a capacidade antioxidante e emulsificante. Os autores empregaram a enzima microbiana oriunda de *Bacillus licheniformis* e a de origem animal, pancreatina, ambas em suas condições ótimas de pH e temperatura, no entanto, estas condições não foram especificadas pelos autores. O resultado

para o grau de hidrólise foi de 8,78% para a enzima *Bacillus licheniformis* e para a pancreatina foi de 5,85%. Além disso, foi comprovado um aumento da capacidade antioxidante e emulsificante, assim como a estabilidade da emulsão das folhas que foram hidrolisadas em relação as que não foram.

Percebe-se que os resultados de produção de hidrolisado de OPN apresentados na literatura, ainda são sucintos, demonstrando a necessidade de investigações sobre este tema e produto pretendido, principalmente no que tange a aspectos importante para aplicações em escala industrial, como os que são investigadas nesta pesquisa, relação proteína:água, enzima:proteína e pré-tratamento.

2.4 Propriedades funcionais e bioatividades

É denominado como propriedades funcionais as características físico-químicas que um ingrediente possui, as quais influenciam na performance da proteína, desde o processamento até o consumo do alimento. As propriedades funcionais podem ser classificadas em solubilidade, viscosidade, capacidade de gelificação e absorção de água, e, propriedades ativas de superfície como capacidade de emulsificação, formação de espuma e filme (VILLAMIL et al., 2017).

As propriedades funcionais tecnológicas são importantes para a fabricação de alimentos, uma vez que, são capazes de contribuir para aspectos relacionados a textura, por exemplo, além de melhorar características nutricionais. Ademais, a combinação dessas características pode reduzir a inserção de estabilizantes nos alimentos (ROMAN & SGARBIERI, 2005; MUZAIFA et al., 2012). Ademais, as funcionalidades estão relacionadas com a estrutura das proteínas, sendo influenciadas pelo grau de hidrólise, peso molecular, conformação e carga das células, e por consequência, a relação enzima/substrato e especificidade da enzima (NELSON & COX, 2002).

A vantagem da utilização do peptídeo em relação à proteína é a capacidade deste difundir rapidamente para a interface através do aumento da

solubilidade, e absorver rapidamente na interface ar/água ou líquido/interface água (LACOU, 2016).

Além do hidrolisado proteico poder apresentar propriedades funcionais, estes ainda podem ser constituídos por peptídeos bioativos. São denominados peptídeos bioativos aqueles constituídos por uma sequência de 2 a 20 aminoácidos que exercem alguma função fisiológica no organismo (LAFARGA & HAYES, 2014). As bioatividades são classificadas de acordo com seu modo de ação, sendo estas definidas por aspectos estruturais, como composição e sequência de aminoácidos (SÁNCHEZ & VÁZQUEZ, 2017).

As atividades biológicas reportadas em relação aos extratos das folhas de ora-pro-nóbis foram atividade antioxidante (SOUZA et al., 2016; GARCIA et al., 2020; TORRES et al., 2021; TORRES et al., 2022), atividade antimicrobiana (SOUZA et al., 2016; GARCIA et al., 2019), presença de compostos fenólicos (SOUZA et al., 2016; GARCIA et al., 2019; GARCIA et al., 2020; MACIEL et al., 2021; TORRES et al., 2021; TORRES et al., 2022). Além disso, também foi atribuído ao extrato de OPN a característica de apresentar atividade antinociceptiva (PINTO et al., 2015) e atividade anticolinérgica e anti-inflamatória (TORRES et al., 2021).

Os radicais livres desempenham um papel fundamental no metabolismo celular, assim como na manutenção da homeostase e na resposta do organismo contra patógenos (YARIBEYGI et al., 2018). No entanto, quando ocorre o desequilíbrio dessa função, ocorre a patologia denominada por estresse oxidativo (PIZZINO et al., 2017).

O estresse oxidativo está associado ao envelhecimento e a doenças crônicas, sendo responsável pelo início e/ou progressão de inúmeras patologias, como câncer (KATERJI et al., 2019), distúrbios cardiovasculares (GRACIA et al., 2017), diabetes (YARIBEYGI et al., 2018), aterosclerose (KATTOOR et al., 2017) e doenças autoimunes (SMALLWOOD et al., 2018).

A atividade antioxidante se refere ao combate de radicais livres no organismo. Em decorrência do processo de hidrólise é liberado moléculas da estrutura originária, a reação propicia também a ação antioxidante no organismo, uma vez que alguns aminoácidos atuam doando prótons ou hidrogênio com carga positiva para reagir com elétrons sem par dos radicais livres, exercendo

deste modo a ação referida (CHALAMAIAH et al., 2012; NAJAFIAN, 2012; GARCÍA-MORENO et al., 2014; LIU et al., 2016).

A presença de atividade antioxidante é vantajosa pois, está relacionada com a estabilidade e vida de prateleira do produto. Sendo que ocorre a diminuição da oxidação lipídica, o que proporciona maior preservação e aumento da vida útil (HERPANDI et al., 2011; BERNARDI et al., 2016). Há diversas classes químicas de compostos que podem apresentar atividade antioxidante, dentre estas, são exemplos, compostos fenólicos, caratenóides, vitamina C (SANTOS-SÁNCHEZ et al., 2019), terpenos e isoprenóides (TETALI, 2019). Rodrigues (2016) incorporou o extrato aquoso das folhas de OPN em mortadelas e notou que houve a redução da oxidação lipídica por um período de 70 dias.

Outra atividade biológica de grande interesse industrial é a atividade antimicrobiana. A capacidade antimicrobiana é de suma importância para a integridade dos produtos, pois, atua inibindo o crescimento de microrganismos, garantindo assim a segurança alimentar e prolongando a vida útil (CRUZ et al., 2014).

A partir da revisão bibliográfica realizada, verifica-se o potencial de aplicação industrial da planta ora-pro-nóbis, em virtude de sua composição nutricional e atividades biológicas expressadas. Diante disso, estão apresentados na Tabela 2.7 dados de pesquisas científicas que demonstram as atividades biológicas da ora-pro-nóbis.

Tabela 2.7- Possíveis aplicações industriais utilizando a OPN

Referência	Forma utilizada	Atividade
Pinto et al. (2006; 2015)	Fração hidrometanólica	Atividade antinociceptiva
Barros et al. (2010)	Pomada	Ação cicatrizante
Gabbiatti et al. (2011)	Extrato bruto das folhas	Houve modificações nos níveis de colesterol total e HDL no grupo com uma dieta padrão e uma tendência de alteração de peso, diâmetro, Índice de Lee e glicose no grupo com uma dieta cafeteira.
Lopes Junior et al. (2012)	Folhas	Aumenta a concentração de ferro no sangue dos leitões recém-nascidos
Pinto et al. (2012)	Extrato bruto em metanol, hexano, diclorometano, acetato de etila das folhas e frações de butanol	Inibição de crescimento de células do adenocarcinoma de mama humano (linhagem celular MCF-7), células de leucemia promielocítica humana (linhagem HL60) e proliferação de células HL60
Carvalho et al. (2014)	Extrato hidroalcólico	Ação cicatrizante em linhagens celulares L929
Pompeu et al. (2014)	Extrato das folhas	Degradação dos inibidores de proteases
Barbalho et al. (2016)	Farinha das folhas	Redução da porcentagem de ganho de peso, gordura visceral, níveis de colesterol total, triglicerídeos, baixa densidade lipoproteína, lipoproteína de muito baixa densidade e aumento de lipoproteínas de alta densidade [HDL-c]
Pinto et al. (2016)	Fração hexânica e metanólica	Cicatrização de feridas

Pinto et al. (2016)	Fração hexânica	Anti-inflamatória aguda e crônica
Garcia et al. (2019)	Extrato etanólico	Apresentou potencial antibiótico, elevada atividade antioxidante, dez compostos fenólicos, sendo dois ácidos fenólicos (derivados do ácido cafeico) e oito flavonóides (derivados de quercetina, kaempferol e isorhamnetina glicosídeo).

Fonte: Adaptado de Santos et al. (2018)

2.5 Justificativa

Diante da pesquisa bibliográfica realizada, e aqui exposta, é notável o elevado potencial de aplicação das folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata*) para a obtenção de extratos vegetais, assim como de hidrolisados proteicos.

Ademais, há uma lacuna em relação aos estudos desta planta alimentícia não convencional no que se refere aos modos de extração, pela técnica de extração assistida por ultrassom e extração supercrítica, principalmente com cossolvente. Pois, ao utilizar estas técnicas o processo se torna mais eficiente, ocorre maior seletividade e menor degradação de compostos. Além disso, há pouca menção na literatura sobre a produção de hidrolisados proteicos das folhas de OPN. A vantagem do processo de hidrólise proteica está na obtenção de biopeptídeos, os quais além de serem mais facilmente absorvidos pelo organismo, podem apresentar propriedades funcionais e bioatividades.

Portanto, este trabalho mostra-se relevante e inovador no contexto atual, devido as amplas aplicações que podem ser supridas, tanto alimentícias quanto farmacêuticas, a partir da referida pesquisa. Algumas vertentes que podem ser beneficiadas por esta pesquisa são, por exemplo, medicamentos para controle de colesterol, cicatrizantes, ou ainda, a utilização do extrato e/ou hidrolisado proteico na produção de alimentos funcionais, como aditivo para redução da oxidação lipídica ou inibição do crescimento microbiano. Além disso, a produção de hidrolisado proteico de OPN é vantajosa por ser uma fonte de proteína alto valor biológico e digestibilidade, podendo ser destinada para públicos especiais como os intolerantes a proteína animal, veganos e vegetarianos.

CAPÍTULO 3 - MATERIAIS E MÉTODOS

Neste capítulo encontram-se descritos os procedimentos que foram utilizados na execução da parte experimental deste trabalho. A Figura 3.1 mostra o fluxograma das etapas realizadas.

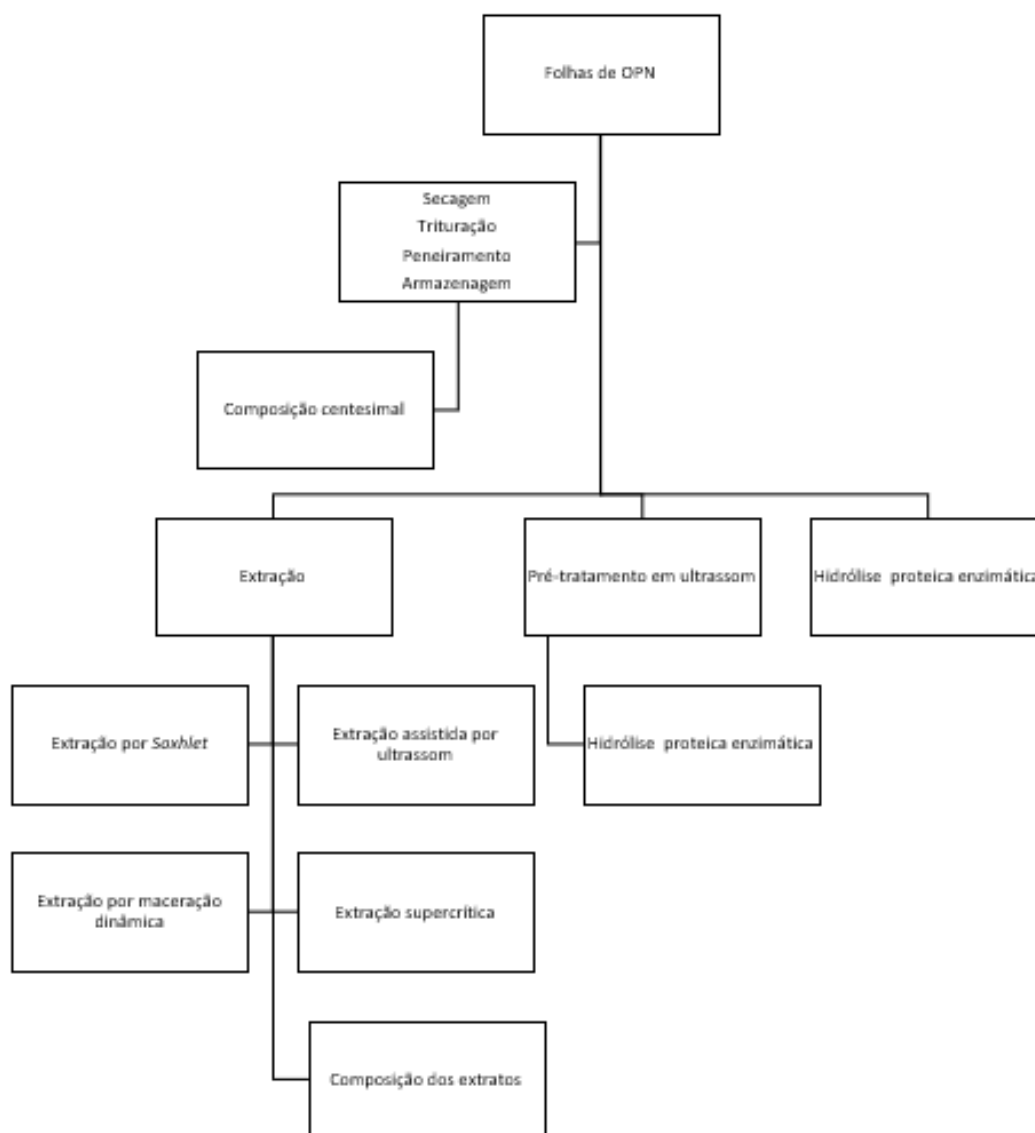


Figura 3.1- Fluxograma das etapas realizadas para a extração e hidrólise das folhas de OPN

3.1 Matéria-prima

As folhas de ora-pro-nóbis usadas nesta pesquisa foram coletadas em propriedade particular situada no município de Toledo-PR, 24° 44'33.81" S,

53°44'57.95" W, caracterizada e devidamente registrada quanto a sua espécie no Herbário da Universidade Estadual do Oeste do Paraná sob o nº UNOP 10803, campus Cascavel-PR.

A coleta das folhas foi realizada sempre em período matutino e sem incidência solar sobre elas (RODRIGUES, 2004). Após a coleta, as folhas foram limpas com água destilada e então secas a 55°C por 72 h (AOAC, 2010) em estufa de secagem com circulação de ar (marca Nova Instruments, modelo NI 1514). Depois de secas, as folhas foram trituradas em liquidificador doméstico e estocadas em freezer (-5°C) até o momento da utilização.

3.2 Caracterização da matéria-prima

A matéria-prima foi caracterizada em termos de composição centesimal, proteína total, lipídeos, matéria mineral e umidade, conforme metodologias descritas na *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC, 2010). As análises foram realizadas em triplicata e o valor expresso pela média aritmética.

3.2.1 Determinação da umidade

O teor de umidade presente nas folhas de OPN foi quantificado pesando-se 20 gramas de amostra, os quais foram colocadas em placas de Petri previamente aquecidas em estufa a 105°C, por 1 hora e resfriadas em dessecador até temperatura ambiente e pesadas. As placas de Petri contendo a amostra foram acondicionadas em estufa de secagem por 72 h à 55°C, sendo então retiradas e resfriadas em dessecador, por fim o conjunto (amostra + placa) foi pesado. O valor da umidade foi determinado pela Equação (3.3).

$$(\%) \text{ Pré - seco} = \frac{(\text{peso seco}) * 100}{\text{peso da amostra}} \quad \text{Eq. (3.1)}$$

$$(\%) \text{ Matéria seca} = \frac{\text{Matéria seca def.} * (\%) \text{ (pré - seco)}}{100} \quad \text{Eq. (3.2)}$$

$$\% \text{ Umidade} = 100 - (\%) \text{ matéria seca} \quad \text{Eq. (3.3)}$$

3.2.2 Determinação de teor de proteína total

Pesou-se 100 mg de amostra, previamente seca e triturada, adicionou-se 5 mL da solução digestora no tubo contendo a amostra, por conseguinte esse material foi levado ao bloco digestor submetido a uma temperatura inicial de 50°C com aumentos periódicos de 50°C a cada 30 min até atingir 450 °C.

Após digestão, esperou-se os tubos esfriarem e adicionou-se 15 mL de água destilada. Consequente, colocou-se 10 mL da solução receptora (ácido bórico) em um Erlenmeyer de 125 mL, acoplou-se o tubo de ensaio com a amostra devidamente digerida e diluída no equipamento destilador, adicionou-se 20 mL de hidróxido de sódio 18 N no aparelho de digestão, fez-se a destilação até que o volume final fosse de 75 mL. Por fim, titulou-se a solução obtida com ácido sulfúrico 0,02 mol L⁻¹. A porcentagem de proteína foi obtida pela Equação (3.4).

$$\% \text{ de Proteína total} = \frac{V * N * Fc * 14 * 100 * f}{Pa * 1000} \quad (3.4)$$

Em que:

V: volume de ácido utilizado na titulação (mL);

N: normalidade do ácido utilizado na titulação (M)

F_c: fator do ácido utilizado para a titulação;

f: fator empírico empregado para a conversão de nitrogênio em proteína (5,75);

P_a: massa de amostra das folhas (g).

3.2.3 Determinação de matéria seca e mineral

Para a matéria seca, pesou-se 2 g amostra em um cadinho, previamente tarado (105°C por 8 h), a amostra e o cadinho foram acondicionados em estufa

à temperatura de 105°C por 8 h, na sequência levou-se o conjunto (cadinho e amostra) para o dessecador até que este esfriasse, por fim pesou-se o conjunto e anotou-se o valor. Posteriormente para determinar o conteúdo de matéria mineral, levou-se o conjunto para a mufla a 550°C e este permaneceu até queima total da matéria orgânica (aproximadamente 4 h). Após este tempo levou-se o conjunto para o dessecador, após resfriar, pesou-se novamente o conjunto. A matéria seca foi determinada utilizando-se a Equação (3.5) e a matéria mineral pela Equação (3.7).

$$\text{Matéria seca definitiva} = \frac{(\text{peso a } 105^{\circ}\text{C} - \text{peso cadinho}) * 100}{\text{peso da amostra}} \quad \text{Eq. (3.5)}$$

$$\% \text{ de Cinzas} = \frac{(\text{peso a } 550^{\circ}\text{C} - \text{peso cadinho}) * 100}{\text{peso seco a } 105^{\circ}\text{C}} \quad \text{Eq. (3.6)}$$

$$\% \text{ de Cinzas} = \frac{\% \text{ de Cinzas} * \text{Matéria seca definitiva}}{100} \quad \text{Eq. (3.7)}$$

3.2.4 Determinação de Lipídeos

A determinação de lipídeos ocorreu no equipamento *Goldfish*, para tanto, pesou-se 2 g da amostra e acondicionou-a em balão volumétrico, o qual foi colocado no bloco de aquecimento, a amostra permaneceu imersa no éter de petróleo por 15 min à 75°C, após este tempo aumentou-se a temperatura para 90°C permanecendo por uma hora e meia. Retirou-se os balões e estes, foram acondicionados em estufa a 55°C para finalizar a evaporação do éter, por fim, retirou-se o balão da estufa, colocou-se este no dessecador até resfriamento completo, em seguida pesou-se o balão. O cálculo do teor de lipídeos foi obtido pela Equação (3.8).

$$\text{Lípídeos (\%)} = \left(\frac{m_{\text{lípídeos}}}{m_{\text{amostra}}} \right) \cdot 100 \quad \text{Eq. (3.8)}$$

Em que:

$m_{lipídeos}$: massa de lipídeos extraídos (g);

$m_{amostra}$: massa de amostra (g).

3.3 Processo de obtenção do extrato vegetal

3.3.1 Extração por Soxhlet

Foi realizada a extração das folhas de ora-pro-nóbis utilizando um conjunto de extrator *Soxhlet*, a metodologia foi adaptada de Santos et al. (2020). Para tanto, aproximadamente, 5 g de folhas de OPN foram envolvidas em papel filtro (Melitta nº 102) e inseridos em um extrator *Soxhlet*. As extrações ocorreram pelo período de 6 h, foram utilizados 250 mL de solvente orgânico testado, hexano, acetato de etila e etanol, cujos quais, possuem índices de polaridade, 0,0, 5,3 e 8,8 (HANSEN 2007), respectivamente. O sistema de extração foi mantido aquecido com o auxílio de uma manta de aquecimento (WEA-500 mL). O condensador foi conectado a um banho termostático (Marconi, modelo MA-184) com temperatura mantida em 5°C. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Ao final da extração, o extrato (líquido) foi colocado em placas de Petri, previamente secas e taradas, estas foram colocadas em estufa de secagem a 60°C até a evaporação completa do solvente. As massas dos extratos secos foram determinadas por pesagem em balança analítica. Os extratos secos foram acondicionados em frascos âmbar a em temperatura de - 4 °C, os experimentos foram realizados em duplicata. O rendimento da extração, em base seca, foi calculado conforme a Eq. (3.9).

$$\text{Rendimento (Yi) (\%)} = \frac{\text{Massa de extrato}}{\text{Massa de amostra}} * 100 \quad \text{Eq (3.9)}$$

3.3.2 Extração assistida por ultrassom (EAU)

A extração assistida por ultrassom foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Palsikowski et al. (2020), com adaptações. O sistema

foi composto por um sonicador ultrassônico (Sonics, VCX 750, Newtown – CT, USA), com potência nominal de 750 W e 20 kHz, com 13 mm diâmetro na sonda de titânio, um reator encamisado de vidro (250 mL), conectado a um banho termostático para controle da temperatura.

Inicialmente, realizou-se uma cinética para determinar o melhor tempo de extração. Para tanto, as extrações foram conduzidas em 40°C, 30% de potência e razão massa/solvente 1:10 (g mL⁻¹), o solvente utilizado foi o que apresentou o melhor rendimento na extração por *Soxhlet*, os tempos avaliados foram de 1, 5, 10 e 14 min.

Após a determinação do tempo de extração foi realizado um planejamento experimental do tipo 2³, avaliando os efeitos da temperatura, potência e razão massa/solvente no rendimento, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH e ABTS). As condições experimentais são expostas na Tabela 3.1. Ao final dos experimentos os extratos foram colocados em estufa de secagem a 55°C até a completa evaporação do solvente. O rendimento foi calculado pela Equação 3.9.

Tabela 3.1- Variáveis e níveis decodificados do Planejamento experimental 2³ para a extração assistida por ultrassom das folhas de OPN

Sigla	Fator	Níveis		
		-1	0	+1
T	Temperatura (°C)	40	50	60
RMS	Razão massa/solvente (g mL ⁻¹)	1/20	1/15	1/10
P	Potência (%)	30	50	70

3.3.3 Extração por maceração dinâmica

Para fins de comparação entre os métodos de extração foi conduzido um ensaio cinético utilizando a técnica de maceração dinâmica, a qual foi realizada em *Shaker* (New Lab, model NL 161-04). A condição experimental utilizada foi 40°C, 100 rpm e razão massa/solvente 1:10 (g mL⁻¹), o solvente usado foi etanol e os tempos avaliados foram de 30, 60, 120, 180 e 360 min. Ao final de cada extração, os extratos foram acondicionados em estufa de secagem a 55°C até a completa evaporação do solvente. O rendimento foi calculado pela Equação 3.9.

3.3.4 Extração Supercrítica com CO₂ (ESC)

Para a realização da extração supercrítica, as folhas previamente secas e trituradas foram separadas em um conjunto de peneiras série Tyler 12,24,28, 32 e fundo. A fração retida na peneira Tyler 24 foi utilizada nos experimentos, o tamanho de partícula escolhida advém do equilíbrio entre aumentar a área de transferência de massa, mas de forma que não ocorra a compactação do leito e formação de caminhos preferenciais (PEREIRA & MEIRELES, 2010).

3.3.4.1 Planejamento experimental

Os experimentos em extração supercrítica com CO₂ foram conduzidos a partir de um planejamento experimental 2² com triplicata no ponto central, as variáveis avaliadas foram pressão e temperatura. Para todos os ensaios experimentais o fluxo de CO₂ foi mantido em 3 L min⁻¹, 1 h de tempo estático e 15 g de folhas. O tempo de extração foi definido a partir de uma curva cinética, até o rendimento ser constante (PALSIKOWSKI et al., 2019). A condição experimental utilizada para a cinética foi 325 bar, 50°C. As condições do planejamento experimental foram definidas baseada em estudos anteriores (TORRES et al., 2021) e estão expostas na Tabela 3.2.

Tabela 3.2- Variáveis e níveis decodificados do Planejamento experimental 2² para a extração supercrítica com CO₂ das folhas de OPN

Fator	Níveis		
	-1	0	+1
Temperatura (°C)	40	50	60
Pressão (bar)	250	288	325

3.3.4.2 Extração com cossolvente

A partir da condição experimental otimizada do rendimento foi realizada a extração com adição de etanol como cossolvente com metodologia adaptada de Santos et al. (2019). O experimento foi conduzido em 325 bar e 60°C, a adição do etanol foi avaliada em 10 e 20% (v/v).

3.4 Análise da composição dos extratos de OPN

3.4.1 Capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante foi avaliada por dois métodos, sendo eles: DPPH de sequestro do radical 1,1 2,2-difenil-1-picrilidrazina e o ABTS (2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline6-sulfonic acid) diammonium salt).

A capacidade antioxidante por DPPH foi realizada conforme metodologia proposta por Li et al. (2021). Os extratos foram diluídos em etanol, de forma a se obter a concentração de 1 mg mL⁻¹. Para a reação, transferiu-se 100 µL do extrato etanólico para a microplaca, em seguida foi adicionado 100 µL da solução do radical DPPH (0,3 mmol/L), a mistura foi homogeneizada sob agitação e ficou na ausência de luz em temperatura ambiente por 30 min. As leituras foram realizadas em espectrofotômetro em comprimento de onda de 530 nm, a análise foi realizada em triplicata. O etanol foi utilizado como branco e o controle negativo foi composto por DPPH e etanol. A curva padrão foi obtida empregando-se o reagente Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), nas concentrações de 11,71 – 200 µmol L⁻¹, os resultados foram expressos em µmol de Trolox por grama de extrato (µmol_{Trolox}.g_{extrato}⁻¹).

O método ABTS foi realizado seguindo a metodologia proposta por Li et al. (2021). Os extratos diluídos em etanol (1 mg mL⁻¹) foram transferidos para a microplaca, 100 µL, em seguida adicionou-se 100 µL de solução ABTS (7 mmol/L), a microplaca foi acondicionada ao abrigo de luz por 10 min. A leitura foi realizada a 750 nm, como controle negativo foi utilizado ABTS + etanol e como branco foi utilizado etanol. Para a curva padrão foi empregado Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilcromano-2-ácido carboxílico), variando de 11,71 a 200 µmol L⁻¹, os resultados são expressos em µmol de Trolox por grama de extrato (µmol_{Trolox}.g_{extrato}⁻¹).

3.4.2 Compostos fenólicos totais (CFT)

Para quantificar os compostos fenólicos presentes no extrato foi empregado o método colorimétrico Folin-Ciocalteu. A análise foi realizada conforme metodologia proposta por Bobo-Garcia et al. (2015).

Os extratos foram dissolvidos em etanol de forma a se obter a concentração de 1 mg mL^{-1} . Transferiu-se $20 \text{ }\mu\text{L}$ do extrato para cada poço da microplaca, em seguida, foi adicionado $100 \text{ }\mu\text{L}$ de Folin-Ciocalteu, deixou-se reagir protegido da luz por 4 min. Após, $75 \text{ }\mu\text{L}$ de solução de carbonato de sódio foram adicionados em cada poço. As microplacas foram acondicionadas em temperatura ambiente e protegidas da luz por 2 h. O branco foi realizado do mesmo modo substituindo o extrato por etanol. A leitura da absorbância ocorreu em comprimento de onda de 750 nm . A curva padrão foi preparada com ácido gálico variando a concentração de $1,56 - 200 \text{ }\mu\text{g mL}^{-1}$. Os resultados foram expressos em mg equivalente de ácido gálico por grama de extrato ($\text{mg EAG.gextrato}^{-1}$).

3.4.3 Determinação da composição química dos extratos de OPN

A identificação dos compostos presentes nos extratos foi realizada de acordo com a metodologia de Palsikowski et al. (2019). A análise ocorreu em um cromatógrafo gasoso acoplado a um detector de massa (GC-MS QP2010 SE, Shimadzu) com um amostrador automático (Shimadzu AOC-20i), com uma coluna SH-RTx-5MS (Shimadzu, 5% fenil-metilsiloxano, $30 \text{ m} \times 0,25 \text{ mm}$ de diâmetro interno, $0,25 \text{ }\mu\text{m}$).

As amostras foram diluídas em etanol ((99,8%), foi injetado no sistema $1 \text{ }\mu\text{L}$ de amostra com uma razão de divisão de 10:1. Como gás de arraste foi usado hélio (99,99%, White Martins) a um fluxo de $1,0 \text{ mL min}^{-1}$. A temperatura inicial da coluna foi de 155°C , em seguida aumentou-se 8°C min^{-1} até atingir 300°C , (permanecendo 8 min nesta temperatura). A temperatura do injetor, fonte de íons e da interface do CG-EM foram mantidas em 280°C , 260°C , 280°C , respectivamente. Os espectros de massa foram registrados a 70 eV com faixa de massa de m/z 50 a 550 amu.

A identificação dos compostos químicos foi realizada comparando os espectros de massa com os espectros do banco de dados dos componentes listados na NIST Spectrum Library (versão 2014). A quantificação dos compostos foi feita utilizando com padrões da empresa Sigma Aldrich, Squalene, Octacosanol, gamma-tocopherol, α -tocopherol. As curvas padrões foram

elaboradas em concentrações de 0,02 a 0,6 mg.mL⁻¹ para o esqualeno, 0,03 to 0,2 mg.mL⁻¹ para o octacosanol e 0,02 to 0,34 mg.mL⁻¹ para o α -tocopherol, a análise foi realizada em triplicata.

3.4.4 Análise de capacidade antimicrobiana pelo método de difusão em disco

A atividade antimicrobiana dos extratos de OPN foi avaliada pelo método proposto por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI) (2003), o qual avalia a inibição do crescimento microbiano, determinado pelo diâmetro do halo de inibição ao redor dos discos. Os microrganismos avaliados foram *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Salmonella sp* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538).

Antes de iniciar a análise, o caldo e ágar Muller Hinton e água salina 0,1% foram autoclavados a 121 °C por 15 min.

As bactérias foram inoculadas, individualmente, em tubos contendo meio caldo Muller Hinton, posteriormente foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C $\pm$ 2 por 18-24 h. Posteriormente, uma alçada do meio foi coletada e estriada em tubo contendo ágar Muller Hinton gelificado, os tubos foram incubados a 35°C $\pm$ 2 por 24 h. Após o crescimento celular, uma porção de massa celular foi ressuspensa em solução salina (NaCl) 0,1%, até obtenção de leitura de 0,08 à 0,10 de absorbância em espectrofotômetro em 625 nm, valor este, corresponde de 1,5x10⁸ UFC mL⁻¹, compatível com o padrão 0,5 da escala McFarland.

As suspensões bacterianas foram inoculadas na superfície de placas contendo ágar Muller Hinton por meio de swabs estéreis. Para a fixação dos extratos foram utilizados discos de papel de filtro de 6 mm de diâmetro em duplicata. Adicionou-se em cada disco 20 μ L de água estéril e fixou-se o extrato de OPN (7 mg). Com o auxílio de uma pinça previamente esterilizada, os discos foram, então, aplicados na superfície da placa já inoculada com cada microrganismo. Como controle positivo foi usado um disco com o padrão de antibiótico Ciprofloxacina (5 μ g 10mL⁻¹) e como controle negativo um disco embebido em água estéril. As placas foram incubadas em estufa bacteriológica a 35°C $\pm$ 2 por 18-24 h, após este período realizou-se a leitura do diâmetro dos halos de inibição com o auxílio de um paquímetro.

3.4.5 Análise estatística

Os resultados referentes aos planejamentos experimentais realizados foram avaliados estatisticamente utilizando o *software* STATISTICA™ (versão 7.0, Statsoft, Inc.). Os efeitos das variáveis estudadas foram calculados e suas interações determinadas por meio de superfície de resposta, validação do modelo ao nível de 5% de significância, análise de variância (ANOVA) e teste F (BARROS et al., 2010). Para a avaliação estatística da composição química dos extratos foi utilizado Teste *Tukey*.

3.4 Hidrólise proteica das folhas de OPN

A hidrólise proteica foi realizada com adaptações na metodologia proposta por Takeiti et al. (2009). Os experimentos foram realizados com duas enzimas comerciais pepsina e pancreatina, ambas da marca Sigma Aldrich. As folhas de OPN utilizadas na hidrólise foram com e sem pré-tratamento com extração assistida por ultrassom.

As folhas de OPN que passaram pela etapa do pré-tratamento, foram filtradas para retirada do solvente etanol, e lavadas sucessivas vezes com água destilada, até eliminação do solvente. Posteriormente, as folhas foram secas em estufa a 55°C para completa evaporação do etanol residual, após este processo as folhas seguiram para a etapa de hidrólise enzimática.

Os ensaios experimentais realizados e suas condições processuais empregadas encontram-se na Tabela 3.3

O pH de cada reação hidrolítica foi ajustado para o pH ótimo de cada enzima, ou seja, pH 5,0 para a pepsina e pH 7,0 para a pancreatina. Os ensaios foram realizados com agitação orbital (*Shaker*) de 100 rpm. Para cada ensaio experimental foi feito um branco nas mesmas condições experimentais, porém sem a adição de enzima.

Tabela 3. 3- Condições experimentais da hidrólise proteica das folhas de OPN

Pré-tratamento					Hidrólise				
Potência (%)	RMS	T (°C)	t (min)	Pulso (s)	Enzima	RES (%)	RSA	T (°C)	t (h)
30	1/10	40	20	2	Pepsina	1	1/8,4	37	24
					Pancreatina	1	1/8,4	37	24
					Pepsina + Pancreatina	1	1/8,4	37	3
					Pancreatina	1	1/8,4	37	21
70	1/20	60	10	-	Pancreatina	1/12,5	1/8,4	45	15
Sem pré-tratamento					Pepsina	1	1/8,4	37	24
					Pancreatina	1	1/8,4	37	24
					Pepsina + Pancreatina	1	1/8,4	37	3
					Pancreatina	1	1/8,4	37	21

RMS: razão massa:solvente, RES: razão enzima:substrato, RSA: razão substrato:água

3.4.1 Determinação do grau de hidrólise (GH).

Para a determinação do grau de hidrólise foi utilizado o método de proteína solúvel em *Kjeldahl* (TAKEITI et al., 2009). O hidrolisado proteico foi centrifugado por 20 min, o sobrenadante foi retirado e neste foi adicionado TCA 20%, a proporção entre amostra e TCA foi de 1:1, a amostra foi homogeneizada e deixada em repouso, após este período o hidrolisado foi filtrado.

Posteriormente, a proteína solúvel presente no hidrolisado foi determinada no *Kjeldahl*, conforme descrito no item 3.2.2. O grau de hidrólise foi determinado conforme Equação (3.10) a qual faz a relação entre a proteína total presente inicialmente na matéria-prima, com a proteína solúvel.

$$GH (\%) = \frac{Proteína\ soluvel\ (mg) * 100}{Proteína\ total\ (mg)} \quad Eq.(3.10)$$

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo serão apresentados os resultados referentes a extração e hidrólise proteica das folhas de OPN. Serão explanados os resultados de composição das folhas, caracterização do extrato e da hidrólise proteica das folhas de OPN.

4.1 Composição centesimal das folhas de ora-pro-nóbis

Os resultados referentes a composição centesimal das folhas de OPN da presente pesquisa e dados da literatura, são demonstrados na Tabela 4.1.

Tabela 4.1- Composição centesimal das folhas de ora-pro-nóbis

	O Autor	Rodrigues (2016)	Almeida et al., (2014)	Barbalho et al., (2016)	Maciel et al., (2021)
Umidade (%)	13,26±0,08	4,83±0,14	12,46±0,47	5,90±0,09	6,87±0,03
Proteína (%)	26,64±0,73	15,71±0,24	28,99±0,59	24,17±0,98	21,81±0,10
Lipídeos (%)	3,65±0,35	3,57±0,23	5,07±0,15	3,71±0,16	7,81±0,30
Matéria mineral (%)	2,75±0,06	-	-	-	-
Cinzas (%)	22,03±0,62	17,25±0,07	14,81±0,18	17,83±0,04	11,90±0,11
Carboidratos totais (%)	34,48±0,36	-	-	48,39±0,96	51,61±0,44

Dados em base seca.

Analisando a Tabela 4.1, nota-se que os teores de umidade e proteína obtidos neste estudo se assemelham aos de Almeida et al. (2014). Além disso, o teor proteico encontrado foi maior do que em vegetais comuns, à exemplo, milho comum (7,6-10% p/p), feijão (18-20% p/p), espinafre (2,2% p/p), couve (1,6% p/p) e alface (1,3% p/p) (ALMEIDA & CAMBRAIA, 1974, MERCÊ et al., 2001).

Nota-se que o teor de proteína encontrado no presente estudo, em massa seca, é de grande relevância, uma vez que foi superior a matérias-primas de origem animal como é o caso do fígado suíno (19,7%) (MALUF et al., 2020), lombo bovino (21%) e lombo suíno (22,2%) (PEREIRA & VICENTE, 2013). É válido salientar, no entanto, que há diferença entre as proteínas de origem

vegetal e animal quanto ao aporte de aminoácidos essenciais e digestibilidade (MACIEL et al., 2021).

Segundo Takeiti et al. (2009), Conceição et al. (2014), Pinto & Scio. (2014) as folhas de OPN apresentam em sua composição todos os aminoácidos essenciais para o consumo humano recomendados pela FAO, além disso, as folhas têm elevado teor de lisina, sendo que este aminoácido, geralmente, é deficiente em cereais.

O valor obtido para o teor de lipídeos foi menor que o observado por Pinto et al. (2001) analisando folhas de taioba (6,00 e 7,06 % nos limbos com e sem nervura, respectivamente) e para folhas de mandioca (9,20%) verificada no estudo de Melo et al. (2007). Para Rocha et al. (2008) o baixo teor de lipídeos nas folhas de OPN as tornam passíveis de utilização em dietas hipolípicas.

Com relação ao teor de carboidratos, estes foram menores do que os verificados no estudo de Almeida et al. (2014). O mesmo autor relata que as condições de cultivo (solo, época de plantio, colheita etc.) podem influenciar na composição nutricional do OPN.

4.2 Extração por Soxhlet

Buscando encontrar o melhor solvente a ser empregado no processo de produção de extrato de OPN, testou-se três solventes com diferentes polaridades, etanol, acetato de etila e hexano utilizando o método de convencional, *Soxhlet*, em tempo fixo de extração de 6 h. Os resultados em relação ao rendimento, atividade antioxidante e compostos fenólicos são apresentados na Tabela 4.2.

Nota-se a influência direta da polaridade no rendimento, quanto maior a polaridade, solvente etanol, maior a quantidade de extrato obtido, 9.98%. Este fato pode ser atribuído a baixa seletividade dos solventes polares. Além disso, verifica-se também o potencial antioxidante da OPN e de compostos fenólicos.

Solventes polares de modo geral extraem açúcares, ácidos orgânicos, proteínas, pigmentos e polifenóis (EFTHYMIPOULOS et. al., 2018). Enquanto o hexano, solvente apolar, costuma favorecer a extração de óleos, carotenoides e aromáticos voláteis (RAPINEL et al., 2017).

Torres et al. (2021) obtiveram resultado comportamento similar ao avaliar a extração das folhas de OPN por *Soxhlet*. As extrações ocorreram por 6 h, o rendimento utilizando etanol foi de $15,08 \pm 2,13$ (%) e para o n-hexano foi $4,66 \pm 0,40$ (%).

Tabela 4.2- Rendimentos para as extrações por Soxhlet com diferentes solventes

Solvente	Índice de Polaridade (Hansen et al., 2007)	Yi (%)	DPPH ($\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$)	ABTS ($\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$)	CFT ($\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$)
Etanol	8,8	$9,98 \pm 1,33$	$79,65 \pm 1,22$	$222,70 \pm 3,14$	$28,71 \pm 3,20$
Acetato de etila	5,3	$6,52 \pm 0,22$	$90,77 \pm 8,58$	$193,10 \pm 1,00$	$34,35 \pm 5,01$
n-Hexano	0,0	$3,54 \pm 0,03$	$66,44 \pm 11,30$	$208,25 \pm 4,50$	$27,40 \pm 0,90$

Vargas (2017) realizou a extração das folhas de OPN, no inverno e verão, utilizando a extração a frio com os solventes éter de petróleo, diclorometano e etanol. O melhor rendimento para as folhas coletadas no inverno foi usando éter de petróleo (1,42%), já para a coleta de verão o maior rendimento foi para o extrato etanólico (2,28%).

As diferenças de rendimento podem ser atribuídas as formas de cultivo, época do ano, nutrientes, além da polaridade e técnicas de extração, entre outros fatores que podem influenciar sua composição.

Em razão do resultado encontrado, o solvente selecionado para ser utilizado na etapa de extração assistida por ultrassom foi o etanol, que além de ter proporcionado o maior rendimento é considerado menos agressivo à saúde humana e meio ambiente (GARMUS et. al., 2015; SIM et. al., 2019), e também, é mais seguro e adequado para uso na indústria alimentícia e farmacêutica (JOVANOVIĆ et al., 2017; DIAS et al., 2017).

4.3 Extração assistida por ultrassom (EAU)

4.3.1 Cinética de extração

Para determinar o melhor tempo de extração a ser empregado no planejamento experimental da EAU, e também, avaliar a técnica de extração por maceração dinâmica, foram realizadas cinéticas de extração, utilizando como solvente etanol, os perfis cinéticos são apresentados na Figura 4.1.

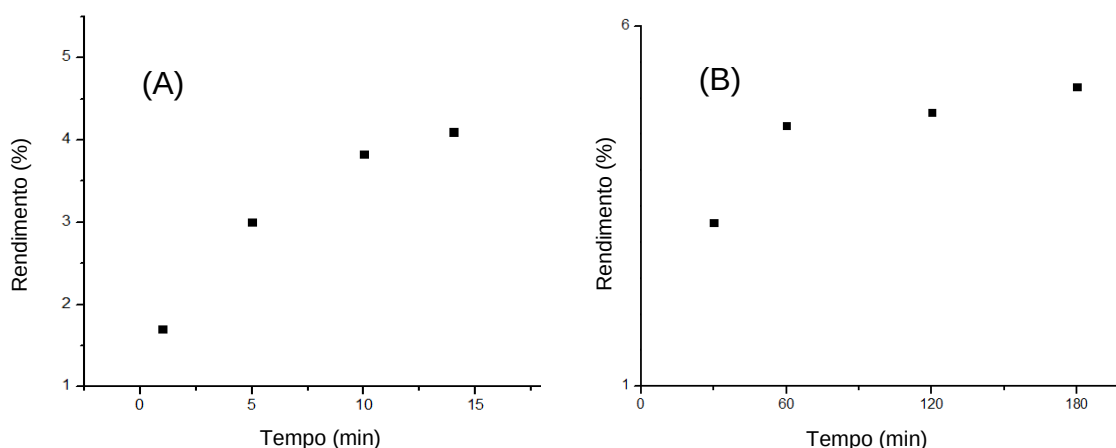


Figura 4.1- Cinética de extração das folhas de OPN pelo método de (a) extração assistida por ultrassom (b) maceração dinâmica

Na cinética da extração assistida por ultrassom (Figura 4.1a) foi observado que nos primeiros 10 min, a taxa de extração foi elevada, obtendo um rendimento de 3,83%, nesta fase, os compostos bioativos solúveis localizados na superfície da planta são extraídos mais facilmente, uma vez que o solvente encontra-se relativamente preservado. No entanto, com o decorrer da extração (15 min), o rendimento pouco aumenta (4,22%), possivelmente, devido a concentração de soluto no solvente aumentar o que gera a diminuição do gradiente de concentração (PALSIKOWSKI et al., 2019).

Na extração por maceração dinâmica (Figura 4.1b) verifica-se que a partir de 60 min (4,62%) não há aumento considerável no rendimento, se comparado com o rendimento em 180 min, o qual foi 5,16%.

Quando compara-se as duas técnicas empregadas, verifica-se que a técnica de EAU é mais promissora para ser utilizada na produção de extrato de OPN, já que o tempo necessário (10-15 min) é no mínimo 6-4 vezes menor, se comparado ao tempo 60 min pela técnica de maceração dinâmica. Isso implica dizer que se forem realizadas 6 extrações por EAU com um tempo de 10 min

cada, seria possível obter um total aproximado de 23% de extrato de OPN, frente a 4,62% no mesmo tempo para a técnica empregando agitação.

Como verificado, o rendimento pela técnica de EAU nos primeiros 10 min de extração foi de 3,83%, enquanto para 15 min, 4,22%, esta variação não foi significativa estatisticamente, de acordo com o Teste Tukey (p-valor =0,2580). Deste modo, optou-se pelo tempo de extração de 10 min para as extrações subsequente empregando esta técnica.

4.3.2 Extração Assistida por Ultrassom: Planejamento experimental 2³

Após a determinação do tempo de extração foi realizado um planejamento experimental fatorial 2³. Os resultados referentes ao rendimento, compostos fenólicos e atividade antioxidante para as condições experimentais avaliadas são expostos na Tabela 4.3.

Tabela 4.3- Rendimento para os ensaios pela técnica de extração assistida por ultrassom das folhas de OPN

Ensaio	P (%)	RMS	T (°C)	Yi (%)	DPPH	ABTS	CFT
					($\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$)	($\mu\text{mol}_{\text{TE}} \cdot \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$)	($\text{mg}_{\text{GAE}} \cdot \text{g}_{\text{extract}}^{-1}$)
1	30	1/10	40	4,07	120,60 ± 7,44	225,88 ± 6,28	98,26 ± 4,17
2	70	1/10	40	4,58	93,90 ± 1,11	265,86 ± 22,33	84,18 ± 2,08
3	30	1/20	40	4,66	98,99 ± 5,50	221,96 ± 3,39	64,95 ± 8,14
4	70	1/20	40	5,13	106,14 ± 6,40	233,39 ± 26,05	81,15 ± 2,71
5	30	1/10	60	4,56	82,92 ± 4,27	265,25 ± 11,67	79,07 ± 8,36
6	70	1/10	60	4,97	61,70 ± 4,06	302,50 ± 9,88	90,27 ± 4,01
7	30	1/20	60	5,26	67,95 ± 1,82	288,53 ± 3,29	73,52 ± 11,91
8	70	1/20	60	5,57	70,75 ± 2,42	266,42 ± 2,47	83,47 ± 0,87
9	50	1/15	50	4,97±0,15	84,92±4,32	312,83±14,33	72,81±5,14

RMS: razão massa/solvente; Yi: rendimento

O maior rendimento foi de 5,57% na condição experimental 8 (70 % de potência, 1/20 razão massa/solvente e 60°C). Nota-se que para aumentar o rendimento se faz necessário aumentar a temperatura e a potência, e diminuir a razão massa/solvente. Esse comportamento é coerente, pois, o aumento da temperatura promove a redução da viscosidade do solvente, o que permite maior penetração deste na matriz vegetal, favorecendo ainda a dessorção e solubilidade dos compostos (CHEMAT et al., 2017).

Os efeitos da cavitação são aumentados quando se eleva a potência, gerando colapsos mais violentos e, conseqüentemente, há maior ruptura do

tecido vegetal, promovendo melhor acesso do solvente ao soluto (HANI et al., 2017). Em relação a quantidade da matéria vegetal, ao adicionar uma quantidade excessiva de material vegetal as ondas ultrassônicas são diminuídas (JOVANOVIĆ et al., 2017). Além disso, ocorre uma diminuição no gradiente de concentração, a qual ocasiona uma redução da taxa de transferência de massa, quando se aumenta a massa e mantém-se o volume de solvente (SANTOS et al., 2019).

Outros autores avaliaram a extração das folhas de OPN por métodos não convencionais. Torres et al. (2021) avaliou a extração de OPN por líquido pressurizado utilizando etanol como solvente, a 50°C, 10 MPa, fluxo de 4 mL min⁻¹ e 15 min, nestas condições o rendimento foi de 6,87%. O mesmo autor também avaliou a extração pelo método da extração supercrítica com CO₂, nas condições experimentais de 25 MPa, 1,2 kg h⁻¹, 120 min, nas temperaturas de 40 °C, 50 °C e 60 °C. Os rendimentos foram 1,78%, 1,69% e 1,68%, respectivamente. O presente estudo apresentou rendimento satisfatório quando comparado a literatura, além disso, a técnica de extração utilizada é eficiente, mesmo com tempo reduzido e utilizando menos solvente.

O planejamento experimental foi avaliado estatisticamente pelo *software Statistica 12.0*, o resultado da análise de variância, gráfico de normalidade, valores preditos *versus* observados, gráfico de Pareto e superfície de resposta são apresentados na Tabela 4.4, Figura 4.2 e 4.3, respectivamente.

Tabela 4.4 - Análise de variância do planejamento experimental 2³ da extração assistida por ultrassom para a variável resposta rendimento

Fonte de variância	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F _{calc}	F _{tab}
Modelo	6	1,5804	0,2634	13,35	6,16
Resíduos	4	0,0789	0,0197		
Falta de ajuste	2	0,0355	0,0177		
Erro puro	2	0,0435	0,0217		
Total	10	1,6593			

R²=0,9524

A partir da análise de variância, Tabela 4.4, verifica-se que o modelo foi significativo quando empregado para fins preditivos, uma vez que pelo teste F obteve-se um F_{calc} (13,35) duas vezes maior que o F_{tab} (6,16) (BARROS et al., 2010) para um intervalo de confiança de 95%, além do coeficiente de

determinação ser de 0,95. Deste modo, pode-se afirmar que o modelo de regressão proposto, utilizando os valores codificados (Equação 4.1) é válido, e permite descrever o comportamento do rendimento do extrato de OPN.

$$Y_i (\%) = 4,88 + 0,21 \cdot P - 0,30 \cdot R + 0,24 \cdot T + 0,01 \cdot P \cdot R - 0,03 \cdot P \cdot T - 0,02 \cdot R \cdot T \quad \text{Eq.(4.1)}$$

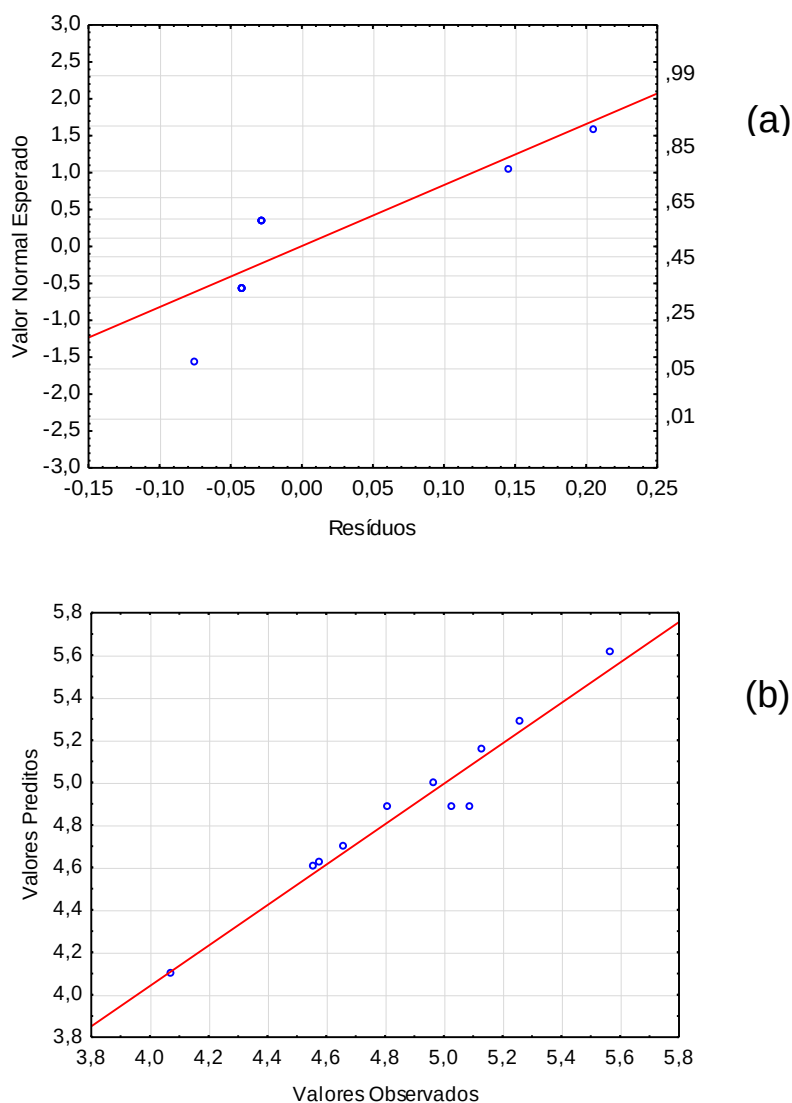
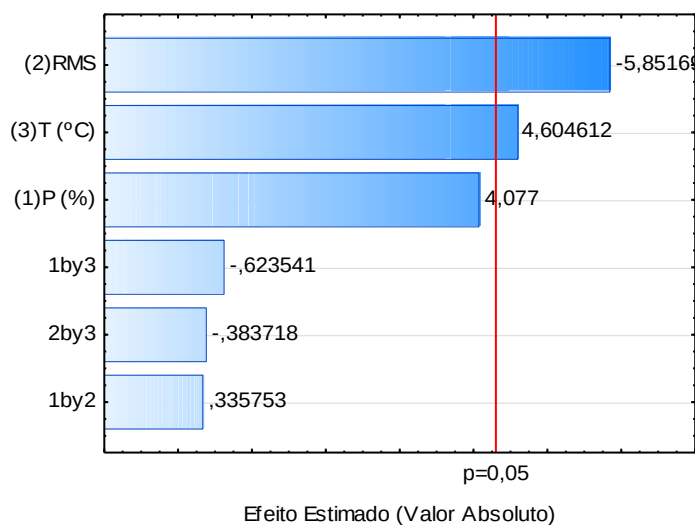


Figura 4.2- Gráfico da normalidade e dos valores preditos *versus* observados para o planejamento experimental 2^3 da extração assistida por ultrassom para a variável resposta rendimento

Ao observar a Figura 4.2 (a), constata-se que a distribuição dos resíduos estão entre -1,5 e 1,5, sendo assim, os dados são normais. Na Figura 4.2 (b), verifica-se ausência de valores discrepantes ou *outliers*.

Avaliando o diagrama de Pareto (Figura 4.3), nota-se que as variáveis que influenciaram no processo de extração das folhas de OPN foram a razão entre massa de folhas e o solvente (RMS) e temperatura, sendo que a razão massa/solvente influenciou de modo negativo no processo, ou seja, quanto menor o RMS maior o rendimento da extração. Enquanto a temperatura impactou positivamente, desse modo, temperatura maiores promovem melhores rendimentos.

A partir das superfícies de resposta, Figura 4.3 (b), nota-se que o rendimento tem relação diretamente proporcional a temperatura e potência, e inversamente proporcional com a razão massa/solvente. Esse resultado corrobora com a literatura disponível sobre o tema, no entanto, deve-se atentar para o aumento da temperatura, uma vez que esta variável pode gerar degradação térmica de compostos bioativos.



(a)

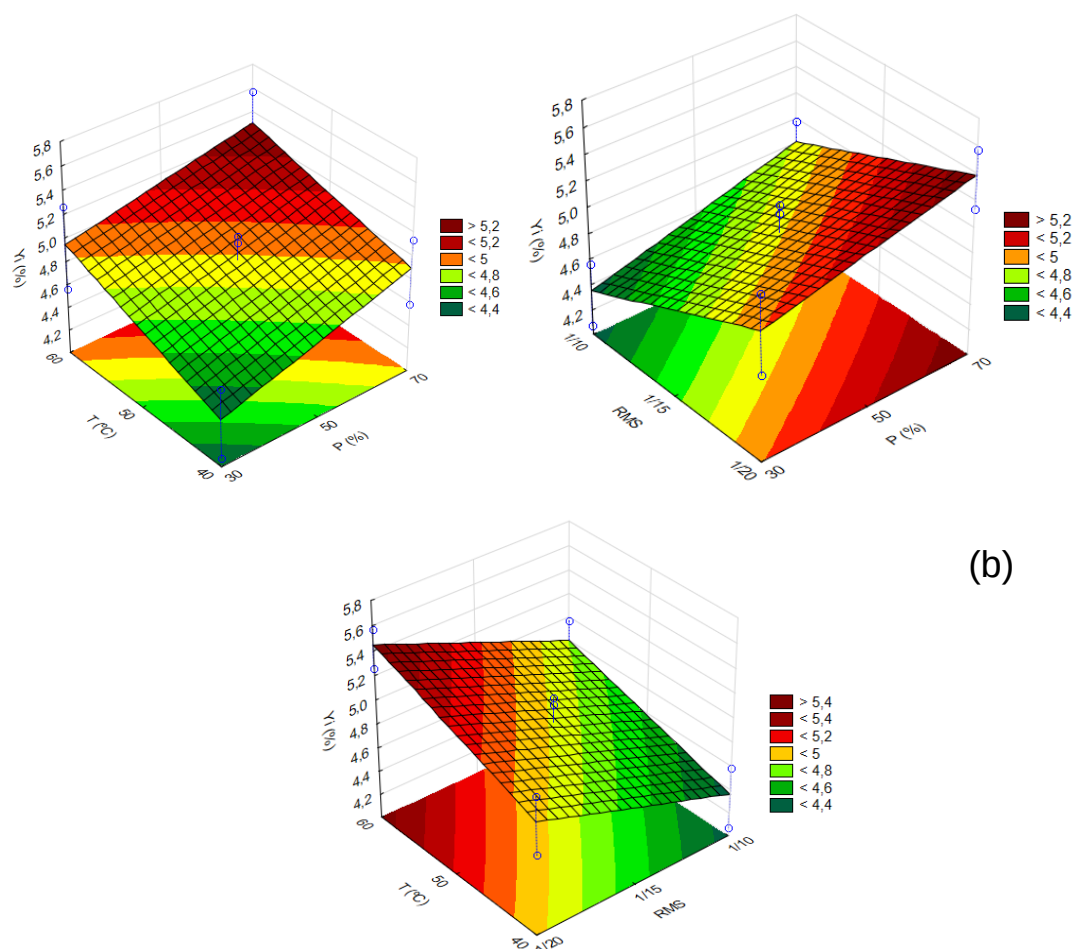


Figura 4.3- Gráfico (a) Diagrama de Pareto e (b) superfícies de resposta para o planejamento experimental 2^3 para a variável resposta rendimento

4.3.2. Avaliação da atividade antioxidante e compostos fenólicos para os ensaios de extração assistida por ultrassom: planejamento experimental 2^3

Os resultados referentes a atividade antioxidante (DPPH e ABTS) e de compostos fenólicos em cada condição experimental estão expostos na Tabela 4.3.

Em relação a atividade antioxidante e teor de compostos fenólicos dos extratos de ora-pro-nóbis (Tabela 4.3), a variação dos compostos fenólicos foi de 64,95 – 98,26 mg_{EAG} g⁻¹ extrato, a capacidade antioxidante avaliada pelos métodos DPPH e ABTS foram de 61,70 – 120,60 μmol_{TE} g⁻¹ extrato e 221,96– 312,83 μmol_{TE} g⁻¹ extrato, respectivamente.

Maciel et al. (2021) estudaram a extração das folhas de OPN utilizando água como solvente. O extrato aquoso foi obtido sob agitação magnética constante, os autores observaram uma quantidade de compostos fenólicos totais de 151,503 mg_{EAG} g⁻¹ extrato. Garcia e colaboradores (2019) avaliaram o extrato hidroalcolico (70% etanol) de ora-pro-nóbis obtido sob agitação (130 rpm) por 2 h, este ciclo foi repetido por três vezes. Por análise cromatográfica foi quantificado 23,75 mg g⁻¹ de compostos fenólicos totais.

Souza et al. (2016) determinaram o teor de compostos fenólicos em extrato de folhas de OPN obtidos por diferentes solventes. Para o extrato metanólico o teor de compostos fenóis foi de 15,04 mg_{EAG} g⁻¹ extrato, enquanto o extrato feito a partir de éter apresentou 11,78 mg_{EAG} g⁻¹ extrato e com o solvente clorofórmio foi de 5,17 mg_{EAG} g⁻¹ extrato. Em outro estudo, Garcia et al. (2020) avaliaram extratos obtidos a partir de uma solução hidroalcolica, água fria e água quente (50 °C) em duas espécies de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* e *Pereskia grandifolia*). Os autores reportaram que a *Pereskia aculeata* apresentou maior quantidade de compostos fenólicos (84,07 µg_{EAG} mg⁻¹) no extrato hidroalcolico, assim como a *P. grandifolia* 49,43 µg_{EAG} mg⁻¹.

Os resultados do presente estudo apresentaram valores superiores aos relatados por Souza et al. (2016), Garcia et al. (2019) e Garcia et al. (2020), essas diferenças podem ser atribuídas a diversos fatores como: época do ano em que foram colhidas as folhas, forma de cultivo, técnica de extração e solventes utilizados.

As matrizes vegetais são reconhecidas por ter intensa atividade antioxidante, a qual é atribuída pela capacidade de sequestro de radicais livres (SOUZA et al., 2014b; BRANDÃO et al., 2020). Devido a este fato, se tornam passíveis de utilização em terapias de doenças inflamatórias (SARAVANAN et al., 2020), câncer (KUMAR & GOEL, 2019), aterosclerose (MALEKMOHAMMAD et al., 2019) e doenças neurodegenerativas (TAVARES et al., 2018).

De acordo com Martelli & Nunes (2014), a produção excessiva de radicais livres beneficia a oxidação de biomoléculas, por exemplo, ácidos nucleicos, proteínas e lipídios. Além do mais, o início e/ou progresso de inúmeras patologias estão associadas com a produção dos radicais livres, dentre as quais

pode-se citar: câncer, diabetes, distúrbios metabólicos e doenças autoimunes (YARIBEYGI et al., 2018; KATERJI et al., 2019).

A atividade antioxidante foi avaliada por dois métodos, DPPH e ABTS, devido ao fato de que a capacidade antioxidante ocorre por diferentes mecanismos, deste modo, torna-se relevante mensurar esta atividade por mais de uma metodologia (GONÇALVES et al., 2019).

O DPPH (2,2-difenil-1-picrilidrazil) é um radical de nitrogênio orgânico, estável, de cor violeta, sua absorção ocorre na faixa de 515-520 nm (SUCUPIRA et al., 2012). Esta metodologia é baseada na capacidade de determinada substância em sequestrar o radical DPPH, reduzindo-o à hidrazina. Quando uma substância doadora de átomos de hidrogênio é adicionada a uma solução com DPPH, ocorre a mudança de coloração de violeta a amarelo pálido devido a hidrazina (ALVES et al., 2010). Este método é vantajoso quando os antioxidantes avaliados são solúveis em solventes orgânicos (LIMA, 2008).

O radical ABTS⁺ é gerado a partir de um precursor, o ácido 2,2-azino-bis(3-etilbenzotiazolin)-6-sulfônico (SUCUPIRA et al., 2012). A metodologia ABTS 2,2-azino-bis(ethylbenzo-thiazoline6-sulfonic acid) diammonium salt) se baseia na capacidade dos antioxidantes capturar o cátion ABTS⁺, reduzindo sua absorbância (PÉREZ-JIMÉNEZ & SAURA-CALIXTO, 2006). A vantagem da utilização deste método é que sua utilização pode ocorrer em antioxidantes hidrossolúveis e lipossolúveis, compostos puros e extratos vegetais (RE et al., 1999; SOUZA et al., 2013).

Neste estudo, a capacidade antioxidante pelo método DPPH foi de 61,70 – 120,60 $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \text{g}^{-1}$ extrato e para o ABTS foram de 221,96– 312,83 $\mu\text{mol}_{\text{TE}} \text{g}^{-1}$ extrato.

No estudo de Garcia et al. (2020) o potencial antioxidante foi mensurado por meio do IC₅₀, definido como sendo a concentração de amostra que reduz em 50% a concentração inicial do antioxidante. Para o extrato hidroalcolico da espécie *P. aculeata* foi 73,30 e 32,57 $\mu\text{g mL}^{-1}$, para o método DPPH e ABTS, respectivamente. Freitas et al. (2021) avaliaram a composição fitoquímica de extratos glicólicos de folhas de ora-pro-nóbis obtidos por meio de maceração. Os autores verificam pela metodologia de DPPH IC₅₀ que este extrato apresentou uma capacidade antioxidante de $9,91 \pm 2,45 \mu\text{g mL}^{-1}$.

De acordo com Garcia et al. (2020) o uso de solventes orgânicos e temperaturas elevadas favorecem a extração de compostos antioxidantes. No entanto, no presente estudo, não foi verificado favorecimento do potencial antioxidante em razão da elevação da temperatura, nos níveis analisados.

A análise estatística foi realizada para os compostos fenólicos e atividade antioxidante (DPPH e ABTS). No entanto, para os compostos fenólicos e a atividade antioxidante por ABTS a variação não foi significativa dentro dos níveis estudados, sendo, portanto, apresentadas no Apêndice. A variável resposta DPPH foi significativa e, portanto, apresentada.

A análise de variância para a atividade antioxidante pelo DPPH (Tabela 4.5) demonstrou que o modelo é significativo e pode ser utilizado para fins preditivos, pois o F_{calc} (28,75) é mais de quatro vezes maior que o F_{tab} (6,16) (BARROS et al., 2010) para um intervalo de confiança de 95%, além disso, o coeficiente de determinação foi de 0,97. Sendo assim, a Equação (4.2) apresenta o modelo de regressão proposto utilizando as variáveis codificadas, que descreve o comportamento da atividade antioxidante por DPPH do extrato de OPN.

Tabela 4.5- Análise de variância do planejamento experimental 2^3 da extração assistida por ultrassom para a variável resposta DPPH

Fonte de variância	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F_{calc}	F_{tab}
Modelo	6	2951,92	491,98	28,75	6,16
Resíduos	4	68,45	17,11		
Falta de ajuste	2	31,07	15,53		
Erro puro	2	37,38	18,69		
Total	10	3020,37			

$R^2=0,9773$

Atividade antioxidante DPPH (%)

Eq. (4.2)

$$= 87.07 - 4.75 \cdot P + 1.91 \cdot R - 17.04 \cdot T - 7.23 \cdot P \cdot R + 0.14 \cdot P \cdot T - 0.43 \cdot R \cdot T$$

Em que: P: potência, R: razão massa/solvente e T: temperatura

Os gráficos que representam a normalidade e os valores preditos *versus* os observados para a variável resposta DPPH estão expostos na Figura 4.4. Em relação a normalidade dos dados, Figura 4.4 (a), nota-se que estes são normais,

pois estão entre -1,5 e 1,0. Pela Figura 4.4 (b) verifica-se a ausência de *outliers*, demonstrando a coerência dos dados experimentais.

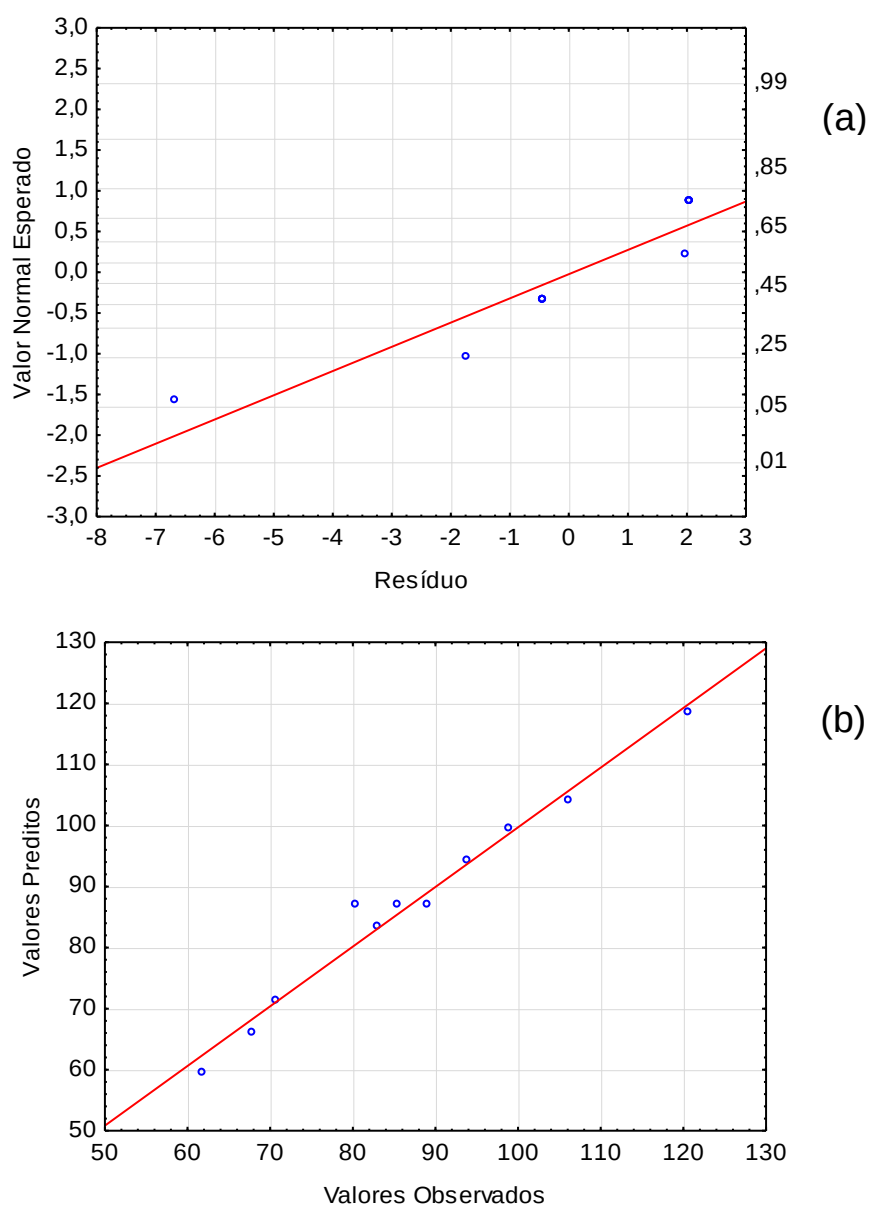


Figura 4.4- Gráfico da normalidade e dos valores preditos *versus* observados para o planejamento experimental 2^3 da extração assistida por ultrassom para a variável resposta DPPH

A influência de cada fator do planejamento experimental para a variável DPPH está exposto no diagrama de Pareto (Figura 4.5). A temperatura e a interação entre temperatura e potência foram significativas no processo de extração. Ambos os fatores influenciaram negativamente, ou seja, quanto menor a temperatura e a potência, maior foi o DPPH.

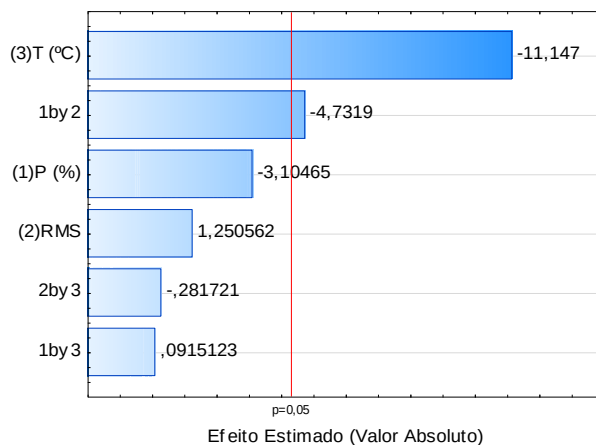


Figura 4. 5- Diagrama de Pareto para o planejamento experimental 2^3 para a variável resposta DPPH

As superfícies de resposta, Figura 4.6, expõem a relação entre os fatores avaliados e o DPPH. A partir das superfícies de resposta foi verificado que quanto menor a temperatura e a potência, e maiores a razão massa/solvente, maiores valores de DPPH são obtidos.

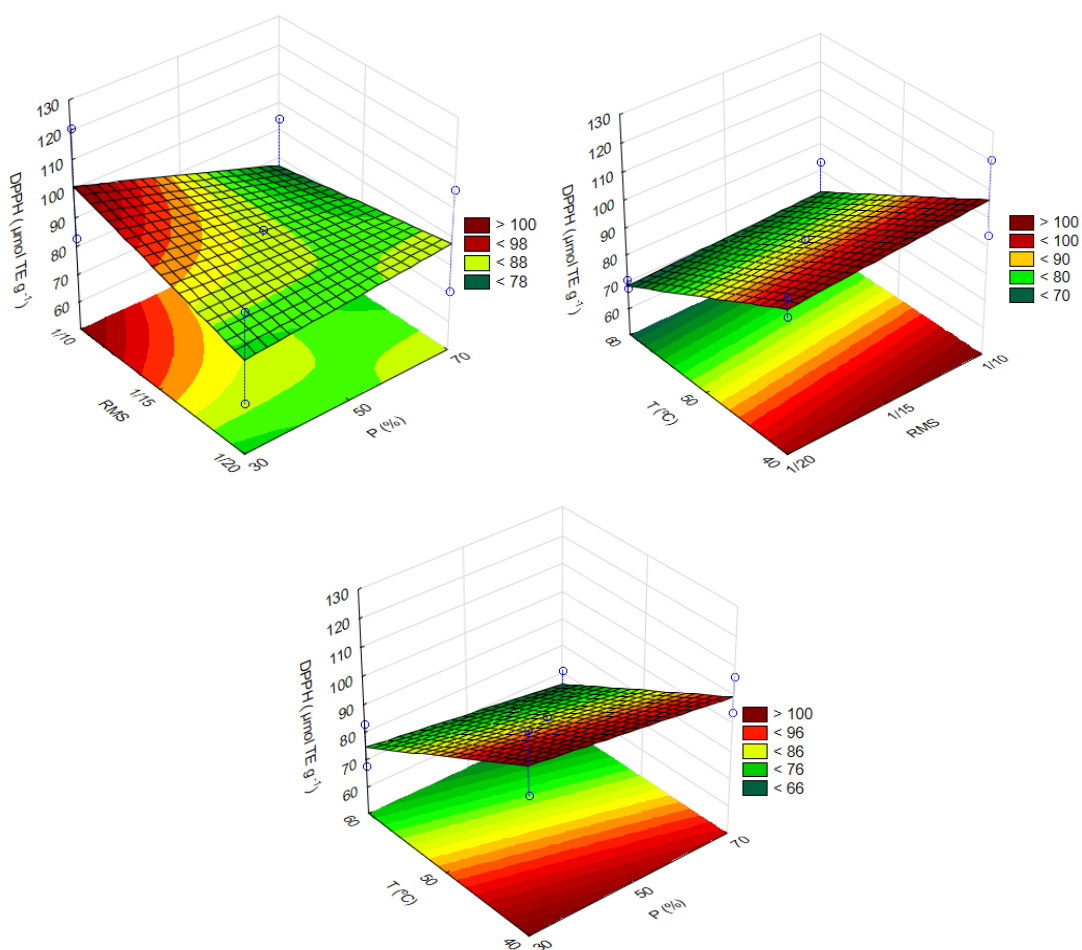


Figura 4.6- Superfícies de resposta para o planejamento experimental 2^3 para a extração assistida por ultrassom para a variável resposta DPPH

4.3.3 Otimização do rendimento do planejamento experimental da extração assistida por ultrassom

Um dos objetivos deste estudo era otimizar o rendimento da extração das folhas de OPN por EAU. O ponto de máximo rendimento, condição otimizada, coincidiu com o ensaio 8 do planejamento experimental, ou seja, 70% potência, 1/20 RMS e 60°C. Deste modo, foi realizada a comparação entre o valor predito e observado, Tabela 4.6, para validar o modelo obtido.

Tabela 4.6- Valores preditos e observados com seus intervalos referente a otimização da extração assistida por ultrassom

Resposta	Valor Predito (%)	95% Conf. inferior	Valor observado (%)	95% Conf. superior
Rendimento	5,61	5,03	5,57	6,19

O valor experimental para o rendimento (5,57%) foi bem próximo ao predito pelo modelo (5,61%), confirmando assim a previsibilidade do modelo para a extração das folhas de *P. aculeata* usando extração assistida por ultrassom.

A extração assistida por ultrassom das folhas de OPN foi satisfatória tanto em relação aos rendimentos alcançados, quanto nos teores de atividade antioxidante presentes nos extratos. A escolha das variáveis e faixas avaliadas permitiram encontrar a condição experimental ótima para o processo, além disso, essa técnica apresenta como vantagem o baixo tempo de extração necessário.

4 4 Extração supercrítica

A extração supercrítica foi realizada a partir de um planejamento experimental 2² com triplicata no ponto central utilizando CO₂ no seu estado supercrítico, os resultados referentes ao rendimento e teor de compostos fenólicos e antioxidantes estão expostos na Tabela 4.7.

Tabela 4.7- Rendimento, teor de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante da extração supercrítica com CO₂ das folhas de OPN

Ensaio	T (°C)	P (bar)	Yi (%)	DPPH ($\mu\text{mol}_{\text{TE}} \text{g}^{-1}$ extrato)	ABTS ($\mu\text{mol}_{\text{TE}} \text{g}^{-1}$ extrato)	CFT ($\text{mg}_{\text{EAG}} \text{g}^{-1}$ extrato)
1	40	250	1,10	55,69 $\pm$ 1,67	184,24 $\pm$ 1,63	12,51 $\pm$ 0,91
2	40	325	1,15	45,18 $\pm$ 1,33	55,80 $\pm$ <0,01	9,81 $\pm$ 0,34
3	60	325	1,39	53,47 $\pm$ 1,32	94,67 $\pm$ 4,29	12,19 $\pm$ 0,61
4	60	250	1,00	54,67 $\pm$ 0,60	97,04 $\pm$ <0,01	10,54 $\pm$ 0,16
5	50	288	1,15 $\pm$ 0,04	46,96 $\pm$ 0,11	42,07 $\pm$ 0,91	13,20 $\pm$ 0,92

O maior rendimento, nas faixas de temperatura e pressão estudadas, foi de 1,39% na condição experimental de 60°C e 325 bar, nota-se também que os rendimentos tiveram pequenas variações (1,00-1,39%). Este resultado é semelhante ao obtido por Torres et al. (2021). Os autores avaliaram diferentes métodos de extração das folhas de OPN (*P. aculeata*), entre eles a extração supercrítica utilizando CO₂ como solvente, os experimentos foram conduzidos a 25 MPa, 120 min, as temperaturas avaliadas foram de 40, 50 e 60°C, o rendimento foi de 1,78, 1,69 e 1,68%, respectivamente.

Sharif et al. (2015) avaliaram a extração das folhas de OPN da espécie *P. bleo* por extração supercrítica por CO₂. Para a condição experimental de 40°C, 25 MPa, 1 h de extração, vazão de 1 mL min⁻¹, o rendimento observado foi de 0,85%.

Ao compararmos o rendimento para a extração realizada com dióxido de carbono supercrítico, extração assistida por ultrassom, maceração dinâmica e *Soxhlet*, verifica-se que este é bem menor que o obtido pelas técnicas citadas. Este fato pode ser atribuído a maior seletividade do CO₂ aos compostos lipídicos. Além disso, as características de cada extração, por exemplo, tipo de solvente empregado, reciclagem do solvente, maior tempo de extração e quantidade de solvente também interferem no rendimento (LUCAS et al., 2002; GUEDES et al., 2020).

Em relação ao teor de compostos fenólicos houve uma variação de 9,81 – 13,20 mg_{EAG} g⁻¹ extrato, já a capacidade antioxidante pelo método DPPH e ABTS foi de 45,18 – 55,69 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}$ g⁻¹ extrato e 42,07 – 184,24 $\mu\text{mol}_{\text{TE}}$ g⁻¹ extrato,

respectivamente. O presente estudo obteve teor de compostos fenólicos maiores do que o encontrado por Torres et al. (2021) e Torres et al. (2022).

Torres et al. (2021) avaliaram a extração supercrítica das folhas de OPN e obtiveram teor de compostos fenólicos de 3,71, 4,19 e 4,90 mg_{EAG} g⁻¹ extrato e DPPH (IC₅₀) 3,09, 6,35 e 5,05 mg mL⁻¹ para a temperatura de 40, 50 e 60°C, respectivamente. A extração supercrítica das folhas de *P. aculeata* com CO₂ também foi avaliada por Torres et al. (2022), nesse estudo a extração ocorreu a 40°C, 250 MPa, 5 L min⁻¹ e com duração de 195 min. Os resultados foram de 1,87% de rendimento, teor de compostos fenólicos de 7,79 mg_{EAG} g⁻¹ extrato e DPPH (IC₅₀) 330,32 µg mL⁻¹.

A análise estatística para as extrações supercrítica das folhas de OPN, planejamento experimental 2² foi realizada, e o resultado para a análise de variância, gráfico de normalidade, valores preditos *versus* observados, diagrama de Pareto e superfície de resposta em relação ao rendimento são apresentados na Tabela 4.8 e Figura 4.7 e 4.8. A análise estatística para o DPPH, ABTS e compostos fenólicos não foram significativas por isso foram apresentadas somente no Apêndice.

A análise de variância, Tabela 4.9, permitiu verificar que o modelo é adequado para prever o comportamento do rendimento da extração das folhas de OPN, pois o F_{calc} (29,66) é mais de três vezes maior que o F_{tab} (9,28) (BARROS et al., 2010) para um intervalo de confiança de 95%, além disso o coeficiente de regressão foi de 0,967, ou seja, o modelo obtido explica 96,7% das variações entre os valores experimentais e os previstos pelo mesmo, o que indica uma boa concordância. O modelo de regressão proposto para prever o rendimento da extração, utilizando variáveis codificadas, é exposto na Equação 4.4.

Tabela 4.8 Análise de variância do planejamento experimental 2² da extração supercrítica com CO₂ para a variável resposta rendimento

Fonte de variância	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F_{calc}	F_{tab}
Modelo	3	0,0822	0,0274	29,66	9,28
Resíduos	3	0,0027	0,0009		
Falta de ajuste	1	0,0003	0,0003		
Erro puro	2	0,0024	0,0012		
Total	6	0,0849			

R²=0,9673

$$Y_i (\%) = 1,15 + 0,03 \cdot T + 0,11 \cdot P + 0,08 \cdot T \cdot P$$

Eq. (4.4)

Constatou-se, também, que os dados do planejamento experimental apresentaram comportamento normal, Figura 4.7 (a), assim como não houve valores discrepantes e/ou *outliers*, Figura 4.7 (b).

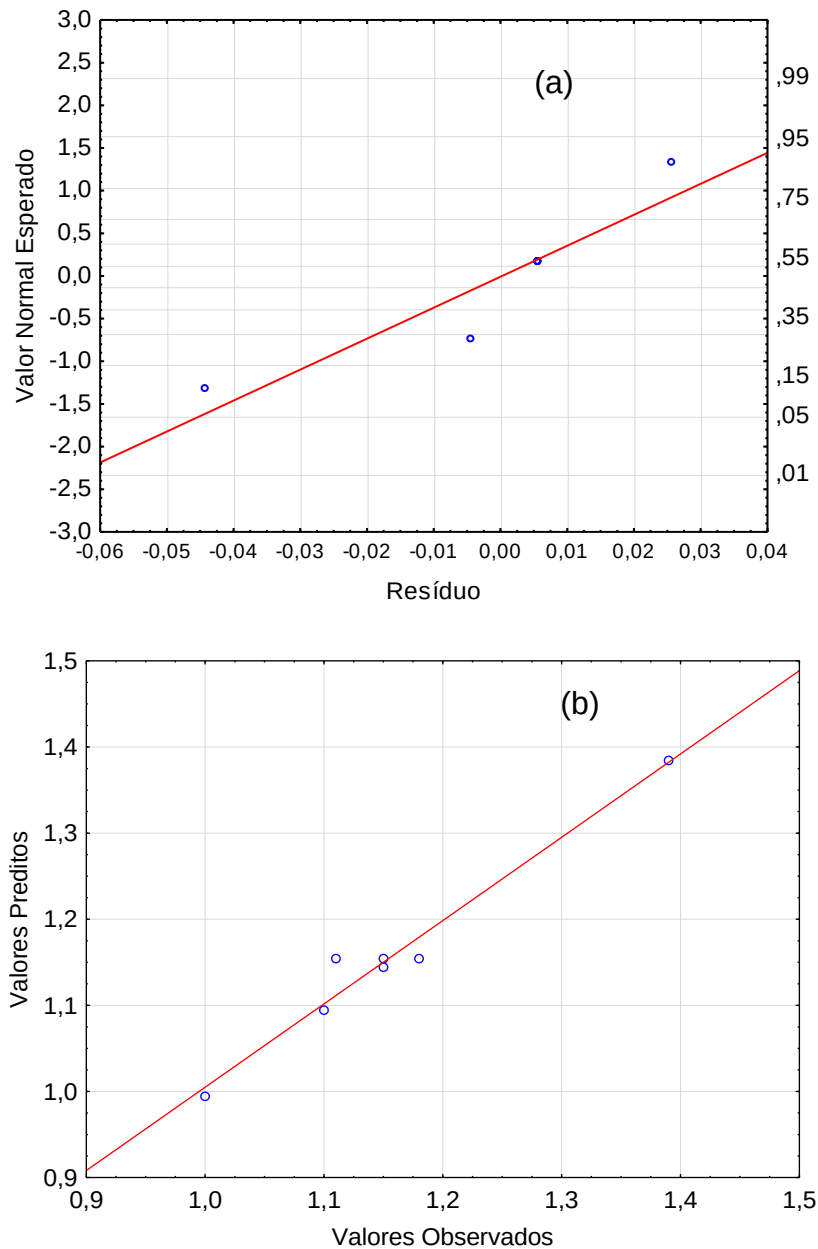
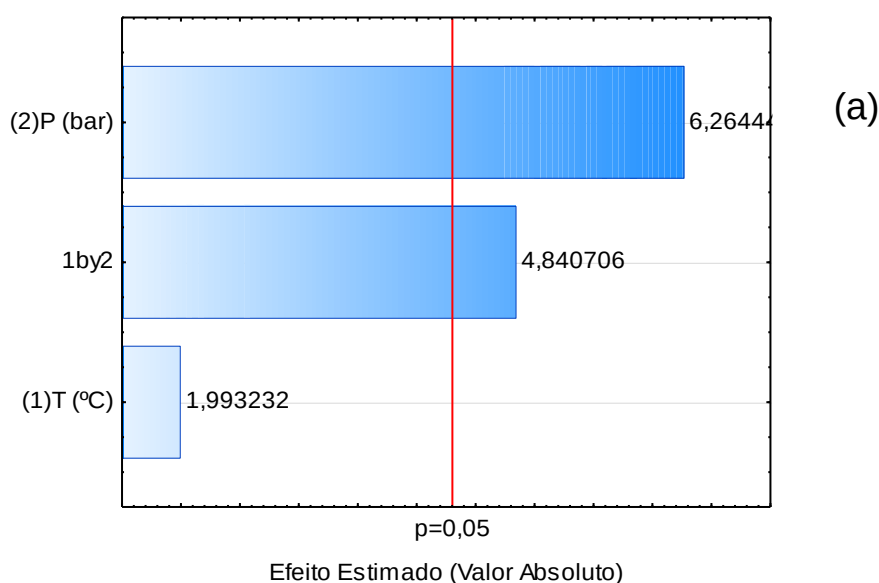


Figura 4.7- Gráfico (a) normalidade (b) valores preditos vs observados referente ao planejamento experimental 2² da extração supercrítica com CO₂ para a variável resposta rendimento

As variáveis pressão e temperatura, assim como a interação entre elas são demonstradas no diagrama de Pareto (Figura 4.8 (a)). Os fatores que influenciaram no processo de extração supercrítica foram a pressão e a interação entre pressão e temperatura, ambas de modo positivo, ou seja, quanto maior a pressão e a temperatura, maior foi o rendimento. Esse comportamento é demonstrado na superfície de resposta, Figura 4.8 (b), o rendimento apresentou uma relação diretamente proporcional a temperatura e pressão, dentro da faixa avaliada.

Cabe ressaltar que temperaturas mais altas promovem maior interação entre soluto e solvente, reduzindo a tensão superficial do solvente, e deste modo aumenta a penetração do solvente na matriz sólida, o que resulta numa melhor taxa de extração (MUSTAFA & TURNER, 2011; TORRES et al., 2021). Em contrapartida, pode haver degradação térmica de compostos de interesse, por exemplo flavonoides, devido ao aumento de temperatura (OKIYAMA et al., 2018; TORRES et al., 2021).



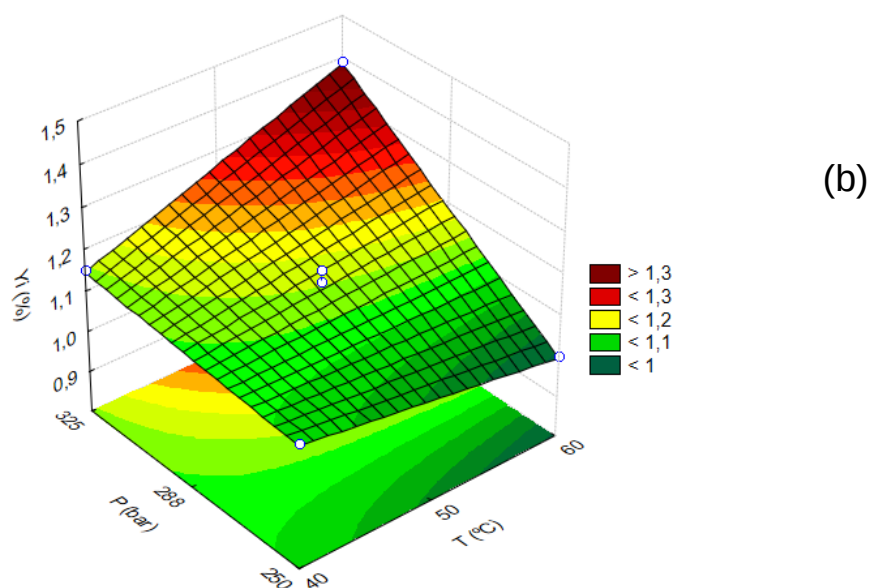


Figura 4.8- Gráfico (a) Diagrama Pareto (b) Superfície de resposta para o planejamento experimental 2^2 da extração supercrítica com CO_2 para a variável resposta rendimento

4.4.2 Otimização do rendimento da extração supercrítica

A condição ótima para o rendimento utilizando a extração supercrítica foi determinada como sendo 325 bar e 60%, esta condição está descrita dentro do planejamento experimental realizado (ensaio 3). Visando validar o modelo obtido foi feita a comparação entre o valor predito e o observado experimentalmente, as informações estão descritas na Tabela 4.9.

Nota-se que o rendimento observado e o predito são muito próximos, o que valida o modelo encontrado como adequado, além de ter sido determinado o máximo rendimento possível nas condições estudadas.

Tabela 4.9- Valor predito *versus* observado na condição ótima para a extração supercrítica com CO_2

Resposta	Valor Predito (%)	95% Conf. inferior	Valor observado (%)	95% Conf. superior
Rendimento	1,38	1,24	1,39	1,53

Também foi avaliada a condição ótima de extração supercrítica adicionando-se cossolvente etanol, o resultado é apresentado na Tabela 4.10.

Tabela 4.5- Ponto ótimo do rendimento do extrato de OPN para o planejamento experimental da extração supercrítica com CO₂ e cossolvente etanol

P (BAR)	T (°C)	VAZÃO (%)	Yi (%)	CFT (mg _{EAG} /g extrato)	DPPH (μmol _{TE} /g extrato)	ABTS (μmol _{TE} /g extrato)
325	60	10	1,47	14,63±1,12	39,86±1,25	113,54±1,68
325	60	20	2,39	17,49±0,47	41,31±0,31	123,06±2,19

O uso do cossolvente etanol na extração supercrítica aumentou o rendimento. Sem o uso de cossolvente o maior rendimento foi de 1,39%, enquanto com 20% vazão de CO₂ de etanol o rendimento foi de 2,39%, um aumento de 70%. A adição de etanol proporcionou rendimentos maiores do que os relatados por Torres et al. (2021) e Torres et al. (2022). Em relação ao teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante por ABTS, a utilização do cossolvente foi benéfica, aumentando a concentração. No entanto, o mesmo não foi verificado para a atividade antioxidante por DPPH. Estes resultados demonstram a viabilidade da utilização do etanol como cossolvente no processo de extração supercrítica com CO₂.

4.5 Composição química do extrato das folhas da OPN

A composição dos extratos resultantes de ambos os métodos não convencionais, extração assistida por ultrassom e extração supercrítica, foram avaliadas. O resultado da composição química e da determinação do esqualeno, octacosanol e α-tocopherol nos extratos de OPN por EAU são expostos nas Tabelas 4.11 e 4.12, respectivamente, os extratos avaliados foram os que apresentaram maior rendimento, teor de compostos fenólicos e atividade antioxidante. A composição química dos extratos obtidos por extração supercrítica é apresentada na Tabela 4.13 e a determinação do esqualeno, octacosanol e α-tocopherol nos extratos de OPN por ESC na Tabela 4.14.

A presença de diversos compostos bioativos de interesse industrial foi notada em ambos os métodos de extração, foram identificados diterpenos como o fitol, triterpenos como o esqualeno, esteróis como o gama- sitosterol, e álcool alifático como o octacosanol.

Para a extração assistida por ultrassom, o aumento da temperatura beneficiou a obtenção do octacosanol, no entanto, para os demais compostos

não foi notado este comportamento. Na extração supercrítica com CO₂ não foi notada diferença no teor dos compostos com o aumento da temperatura ou pressão. No entanto, a concentração de esqualeno e octacosanol por extração supercrítica foi cerca de três vezes maior do que quando utilizado a extração assistida por ultrassom. Torres et al. (2021) em seu estudo, verificaram que o aumento da temperatura ocasionava maior abundância do composto bioativo, exceto para o composto α -tocoferolquinona.

O composto com maior concentração em ambos os tipos de extrações, no presente estudo, foi o fitol, o qual variou de 17,64 – 24,61% para a EAU e 39,13 – 45,91% por ESC. O fitol é um importante composto, faz parte das moléculas da vitamina E e vitamina K (OGUNLESI et al., 2009; SARAVAVAN et al., 2018), possui atividade antimicrobiana, anticancerígenos, propriedades diuréticas e anti-inflamatórias (SILVA et al., 2014; SARAVAVAN et al., 2018).

Tabela 4.6– Composição química dos extratos de OPN referente aos ensaios 1, 8 e 9 do planejamento experimental 2³ obtidos por extração assistida por ultrassom

Composto	Fórmula Molecular	TR (min)	Ensaio 1	Ensaio 8	Ensaio 9
Neophytadiene	C ₂₀ H ₃₈	7,804	4,10±0,45 ^a	ni	2,88±0,48 ^a
Fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	11,717	17,64±0,47 ^a	24,61±2,22 ^a	24,61±2,38 ^a
Docosane	C ₂₂ H ₄₆	19,283	ni	ni	0,88±0,11 ^a
2-methyloctacosane	C ₂₉ H ₆₀ O	21,587	1,61±0,08 ^b	2,83±0,30 ^a	2,24±0,14 ^{ab}
1-Heneicosanol	C ₂₁ H ₄₄ O	21,694	2,56±0,13 ^b	4,26±0,54 ^a	3,78±0,22 ^{ab}
Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	23,763	9,02±0,83 ^a	ni	ni
Hexacosyl acetate	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	25,040	2,61±0,09 ^a	1,97±0,11 ^a	ni
tricosyl acetate	C ₂₅ H ₅₀ O ₂	25,048	ni	ni	1,91±0,33 ^a
Ergost-5-en-3-ol, (3.beta.)-	C ₂₈ H ₄₈ O	25,799	4,12±0,11 ^a	3,32±0,34 ^a	ni
gamma sitoserol	C ₂₉ H ₅₀ O	27,025	16,62±0,47 ^a	15,16±1,17 ^a	15,01±0,27 ^a

TR: Tempo de retenção. Letras diferentes representam diferença estatística entre as áreas dos compostos entre as três condições (ensaio 1, 8 e 9).

Tabela 4.7– Determinação de esqualeno, octacosanol e α -tocopherol nos extratos de OPN referente aos ensaios 1, 8 e 9 do planejamento experimental 2³ obtidos por extração assistida por ultrassom

Ensaio	Potência (%)	RMS	Temperatura (°C)	Esqualeno g/100 g	Octacosano l g/100 g	α -tocoferol g/100 g
1	30	1:10	40	0,76±0,01 ^a	0,72±0,01 ^b	0,71±0,02 ^a
8	70	1:20	60	0,52±0,01 ^b	0,88±0,04 ^a	0,32±0,02 ^b
9	50	1:15	50	0,50±0,01 ^b	0,77±0,05 ^b	0,33±0,03 ^b

RMS: razão massa/solvente. Letras diferentes representam diferença estatística entre as concentrações dos compostos entre as três condições (ensaio 1, 8 e 9).

Tabela 4.8—Composição química dos extratos de OPN referente aos ensaios 2, 3 e 7 do planejamento experimental 2² obtidos por extração supercrítica com CO₂

Composto	Fórmula Molecular	TR (min)	Ensaio 2	Ensaio 3	Ensaio 7
fitol	C ₂₀ H ₄₀ O	11,713	39,13±0,03 ^c	45,91±0,01 ^a	44,35±0,42 ^b
Heneicosane	C ₂₁ H ₄₄	21,546	1,46±0,20 ^a	n.i	n.i
2-methyloctacosane	C ₂₉ H ₆₀	21,55	n.i	n.i	1,68±0,01 ^a
Tetratetracontane	C ₄₄ H ₉₀	21,583	n.i	1,40±0,21 ^a	n.i
1-Heneicosanol	C ₂₁ H ₄₄ O	21,648	2,68±0,06 ^b	3,46±0,06 ^a	3,31±0,09 ^a
Hexacosyl acetate	C ₂₈ H ₅₆ O ₂	24,988	1,27±0,06 ^a	1,38±0,04 ^a	1,41±0,02 ^a
Ergost-5-en-3-ol, (3,β)-	C ₂₈ H ₄₈ O	25,73	1,62±0,02 ^b	1,96±0,07 ^a	1,97±0,01 ^a
gamma sitosterol	C ₂₉ H ₅₀ O	26,959	6,51±0,28 ^b	n.i	8,00±0,16 ^a

n.i: não identificado. Letras diferentes representam diferença estatística entre as áreas dos compostos entre as três condições (ensaio 2, 3 e 7).

Tabela 4.9— Determinação de esqualeno, octacosanol e α-tocopherol nos extratos de OPN referente ao planejamento experimental 2² obtidos por extração supercrítica com CO₂

Ensaio	T (°C)	P (bar)	Esqualeno g/100 g	Octacosanol g/100 g	α-tocopherol g/100 g
1	40	250	2,21 ± 0,04 ^b	1,48± 0,10 ^c	0,77± <0,01 ^a
2	40	325	2,47 ± 0,01 ^a	1,52± 0,02 ^{bc}	0,21± <0,01 ^c
3	60	325	2,00 ± 0,01 ^{bc}	1,63± <0,01 ^{bc}	0,74± 0,05 ^a
4	60	250	1,95 ± 0,03 ^c	2,65± 0,04 ^a	0,58± < 0,01 ^{ab}
5	50	288	2,10 ± 0,14 ^{bc}	2,07± 0,41 ^{abc}	0,72± 0,14 ^a
10% etanol	60	325	1,45 ± 0,03 ^d	2,13± 0,05 ^{ab}	0,54± 0,01 ^{ab}
20% etanol	60	325	0,94 ± <0,01 ^e	1,80± 0,02 ^{bc}	0,47± 0,01 ^b

Letras diferentes representam diferença estatística entre as concentrações dos compostos entre as condições experimentais.

Outros compostos com relevância industrial também foram observados nos extratos de OPN do presente estudo, dentre eles, o gama-sitosterol que pode ser utilizado no tratamento antihiperglicêmico e se mostrou eficaz na inibição do crescimento de células cancerosas (SIRIKHANSAENG et al., 2017). O tetratetracontane possui atividade antioxidante, citoprotetora e anti-inflamatória (ALSULTAN et al., 2019; AMUDHA et al., 2018; JAYAKAR et al., 2020). Além desses, o 2-metiloctacosano apresenta atividade antimicrobiana contra os microrganismos *A. flavus*, *C. albicans*, *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus* (PELO et al., 2021).

Garcia et al. (2019), encontraram no extrato de OPN a existência de ácido caftárico, quercetinas, kaempferol, derivados do ácido cafeico. Pinto et al. (2015) identificaram na fração hidrometanólica do extrato de OPN os compostos triptamina, abrina, mescalina, hordenina, petunidina, isômeros de di-terc-butilfenol e quercetina. Já Souza et al. (2014) analisaram a composição do óleo essencial de *Pereskia aculeata* os principais compostos identificados foram fitol (29,4%), ácido hexadecanóico (17,4%) e ácido linoleico (12,7%).

Dos antioxidantes encontrados em óleos vegetais os tocoferóis são os mais importantes (SCHMIDT & POKIRNÝ, 2005). Além disso, o α -tocopherol é o único tocoferol absorvido de maneira eficiente pelos seres humanos (SHAHIDI & CAMARGO, 2016; BARZOTTO et al., 2019).

Os fitoesteróis da subclasse 4-desmetil, a qual tem como principais representantes o β -Sitosterol, campesterol e estigmasterol possuem efeito hipocolesterolêmico (BRUFAU et al., 2008). Katan et al., 2003 realizaram um estudo com 41 ensaios clínicos com alimentos enriquecidos com fitoesteróis, variando o tempo de tratamento entre 1,4 e 52 semanas e notaram que o consumo de 2 g /dia de fitoesteróis reduz em 10% o nível de colesterol LDL.

A presente pesquisa é a primeira a relatar a presença de octacosanol em extratos de OPN, este composto tem se mostrado promissor no tratamento da doença de Parkinson, entre outras aplicações.

Kaushik et al., (2017) avaliaram a administração de octacosanol em camundongos com a finalidade de avaliarem a insônia causada pelo estresse. Os autores verificaram que houve melhora no sono não REM (NREM) dos camundongos, induzindo o sono fisiológico, não afetando a qualidade do sono. O octacosanol atua diminuindo os níveis de corticosterona, reduzindo o estresse e consequentemente, melhorando o sono. Além disso, o octacosanol também tem se mostrado um composto eficiente para o tratamento da doença de Parkinson, como mostrou o estudo de Wang et al (2010) e Wang et al. (2012).

Além disso, o octacosanol é reportado na literatura como tendo: efeito redutor de colesterol, propriedades antiagregantes, uso citoprotetor e propriedades (TAYLOR et al., 2003), atividade antiúlcera (CARBAJAL et al., 1995), anti-inflamatória (FERNANDEZ-ARCHE et al., 2009; RAVELO et al., 2011), reduz lesão hepática (OHTA et al., 2008).

Outro composto relevante encontrado nos extratos foi o esqualeno, que é de interesse comercial para uso como ingrediente em cosméticos, alimentos e fármacos. O uso em cosméticos é devido a suas propriedades emoliente e antioxidante (HUANG et al., 2009), além disso, sua utilização reduz a possibilidade de alergias, uma vez que o esqualeno está presente no sebo da epiderme humana (BLASCO et al., 2006).

Há pesquisas que reportam que o uso de esqualeno em combinação com drogas antitumorais diminuem o crescimento de células cancerosas (MURAKOSHI et al., 1992; SMITH et al., 1998). Ademais, o esqualeno pode ser utilizado em vacinas. Estudos realizados em camundongos e primatas não humanos que demonstraram que, além de seu papel como carreadores de antígenos, os adjuvantes à base de esqualeno aumentam as respostas imunes inatas e adaptativas (DUPUIS et al., 1999; MOSCA et al., 2008; CALABRO et al., 2011).

4.6 Atividade antimicrobiana dos extratos obtidos por extração assistida por ultrassom

A atividade antimicrobiana do extrato de OPN obtido pela extração assistida por ultrassom foi avaliada no presente estudo, utilizando bactérias gram-negativas (*E. coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Salmonella* sp.) e gram-positiva (*S. aureus*), como controle positivo foi utilizada ciprofloxacina, os resultados são expostos na Tabela 4.15.

Houve a presença de atividade antimicrobiana para os extratos de OPN, exceto para o ensaio 1. Para a *S. aureus* houve atividade antimicrobiana e o tamanho do halo foi semelhante para todas as amostras. Já para a *Salmonella* somente o ensaio 7 teve atividade, enquanto para *P. aeruginosa* houve atividade antimicrobiana apenas para as amostras 5, 6 e 8. Nenhuma das amostras avaliadas apresentaram atividade antimicrobiana para a *E. coli*.

A inibição para o *Staphylococcus aureus* decorre do fato desta bactéria ser Gram-Positiva, ou seja, a permeabilidade da parede celular é maior, pois são compostas por aproximadamente 90% de peptidoglicanos (TRABULSI et al., 1999). Os agentes antimicrobianos podem influenciar sobre a parede celular

e/ou membrana celular o que pode levar a destruição desses microrganismos (RANG et al., 1997; TRABULSI et al., 1999).

O gênero *Staphylococcus* tem como características, formato de cocos Gram-Positivos, não esporulados, onde a espécie *S. aureus*, é a mais importante do gênero e representa de 50 a 87% das infecções hospitalares (SILVA et al., 2010).

Souza et al. (2016) verificaram que o óleo de OPN extraído com éter de petróleo teve excelente atividade antimicrobiana com o microrganismo *E. Coli*. Enquanto, os extratos de OPN com metanol e clorofórmio não apresentaram atividade significativa contra a mesma cepa.

A atividade antimicrobiana pode ser atribuída a composição do extrato, no entanto, não é possível atribuir a um único composto o resultado encontrado nesta pesquisa.

Tabela 4.10- - Atividade antimicrobiana do extrato das folhas de OPN obtidos por extração assistida por ultrassom

Amostra	<i>Staphylococcus aureus</i> (cm)	<i>Salmonella</i> (cm)	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (cm)	<i>E. coli</i> (cm)
CP	3,2	3,0	3,1	1,4
1	n.d	n.d	n.d	n.d
2	1,1	n.d	n.d	n.d
3	1,3	n.d	n.d	n.d
4	1,2	n.d	n.d	n.d
5	1,1	n.d	0,9	n.d
6	1,1	n.d	0,9	n.d
7	1,0	0,8	n.d	n.d
8	1,0	n.d	0,9	n.d
9	1,03±0,15	n.d	n.d	n.d

n.d: não detectado

No estudo realizado por Garcia et al. (2019) o extrato hidroetanólico de folhas de OPN demonstraram atividade antimicrobiana para as bactérias Gram-Positivas (*Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*) e Gram-Negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Morganella morganii*, *Proteus mirabilis*, e *Pseudomonas aeruginosa*), o autor atribuiu este resultado a presença de rutina nos extratos, sendo que Soni et al. (2013) avaliaram o poder de inibição da rutina

em sistema hidrogel contra *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus glurance* e *E. coli* e verificaram resultados promissores. Além disso, a rotina já foi empregada para complementar o efeito antibacteriano de outros flavonoides (GULLÓN et al., 2017).

4.7 Hidrólise proteica das folhas de OPN

O resultado das diferentes condições experimentais avaliadas de hidrólise proteica das folhas de OPN são apresentadas na Tabela 4.16.

Tabela 4.11- Grau de hidrólise para diferentes condições experimentais

Pré-tratamento					Hidrólise					
Potência (%)	RMS	T (°C)	t (min)	Pulso (s)	Enzima	RES (%)	RSA	T (°C)	t (h)	GH (%)
30	1:10	40	20	2	Pepsina	1	1:8,4	37	24	3,17
					Branco	-	1:8,4	37	24	1,69
					Pancreatina	1	1:8,4	37	24	2,28
					Branco	-	1:8,4	37	24	2,06
					Pepsina + Pancreatina	1	1:8,4	37	3	5,00
					Branco	1	1:8,4	37	21	
70	1:20	60	10	-	Pancreatina	1:12,5	1:8,4	37	24	1,82
					Pepsina	1	1:8,4	37	24	8,54
					Branco	-	1:8,4	37	24	1,82
					Pancreatina	1	1:8,4	37	24	6,08
					Branco	-	1:8,4	37	24	2,47
					Pepsina + Pancreatina	1	1:8,4	37	3	5,84
Sem pré-tratamento					Branco	1	1:8,4	37	21	
					Branco	-	1:8,4	37	24	1,64

RMS: razão massa:solvente, RES: razão enzima:substrato, RSA: relação substrato:água

Os melhores resultados foram para as hidrólises que não passaram pelo processo de pré-tratamento de extração assistida por ultrassom. A enzima pepsina proporcionou o maior grau de hidrólise (8,54%). Gilmartin & Jervis (2002) relata que a combinação de enzimas pode resultar na produção de peptídeos de baixo peso molecular, quando comparado com o uso de enzimas individuais.

O grau de hidrólise é influenciado por diferentes fatores, entre eles, relação enzima:substrato, pH, temperatura que afetam a taxa de reação e o

tempo de hidrólise que afeta diretamente somente o grau de hidrólise (BENÍTEZ et al., 2008).

Marques et al. (2021) estudaram o efeito da hidrólise proteica das folhas de OPN na atividade antioxidante e emulsificante. Os autores avaliaram as enzimas endoproteases *Bacillus licheniformis* e a pancreatina, ambas em suas condições ótimas de pH e temperatura. O grau de hidrólise foi de 8,78% para a enzima *Bacillus licheniformis* e para a pancreatina foi de 5,85%. Além disso, as folhas hidrolisadas aumentaram a capacidade antioxidante, emulsificante, assim como a estabilidade da emulsão do que as folhas não hidrolisadas.

Há escassez de dados literários acerca de hidrólise de folhas de OPN, assim como de outras PANCs, o que dificulta comparações. Os resultados do presente estudo são promissores e permitem vislumbrar a obtenção de um hidrolisado proteico diferencial para o mercado.

O hidrolisado proteico feito a partir de folhas de OPN apresenta elevado potencial de aplicação industrial, podendo ser utilizado como agente espessante, antioxidante tanto em alimentos quanto fármacos. Além disso, a hidrólise proteica pode gerar peptídeos bioativos que possuem interesse comercial elevado. No entanto, é necessários análises de fracionamento para verificar o tamanho do peptídeos formados e possíveis usos.

CAPÍTULO 5 – CONCLUSÕES

- A composição centesimal das folhas de *Pereskia aculeata* mostrou elevado teor de proteínas, o qual é importante para obter um hidrolisado proteico de qualidade.
- A extração assistida por ultrassom se mostrou eficiente para obtenção de extratos de ora-pro-nóbis com elevados teores de compostos fenólicos e atividade antioxidante.
- Foi possível otimizar o rendimento para os dois tipos de métodos não convencionais de extração empregados, extração assistida por ultrassom e extração supercrítica com CO₂.
- O uso de cossolvente (etanol) na extração supercrítica com CO₂ promoveu um aumento de 70% no rendimento da extração.
- A composição química dos extratos revelou a presença de compostos relevantes para uso industrial, como octacosanol, esqualeno e α -tocopherol, tanto para a extração assistida por ultrassom quanto para a extração supercrítica com CO₂.
- Os extratos obtidos por extração assistida por ultrassom apresentaram atividade antimicrobiana para os microrganismos *S. aureus*, *Salmonella* e *Pseudomonas aeruginosa*.
- A hidrólise proteica com enzima pepsina, sem a necessidade de pré-tratamento, se mostrou promissora.

CAPÍTULO 6 – SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

As sugestões para trabalhos futuros são:

- Obter a melhor condição de hidrólise proteica das folhas de OPN.
- Realizar as análises de composição elementar das folhas de OPN e hidrolisados proteicos.
- Analisar o perfil peptídico obtido na melhor condição de hidrólise por meio de eletroforese.
- Determinar as propriedades funcionais do hidrolisado de OPN.

CAPÍTULO 7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADLER-NISSEN, J. **Enzimic hydrolysis of food proteins**, Barking: Elsevier Applied Science, 1986, 427 p.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; PÊSSOA, G. K. A.; SILVA, D. B.; GOMES, I. S.; SILVA, J. P. Carotenoid composition of berries and leaves from a Cactacea-Pereskia sp, **Journal of Funcional Foods**, 2, 178-184,2014.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; WONDRACECK, D. C.; ROCHA, W. D. S.; SILVA, D. B. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeate* Miller, **Revista Brasileira de Fruticultura**, 34(1), 234-238, 2012.
- ALBUQUERQUE, M. G. P. T.; SABAA-SRUR, A. U. O.; FREIMAN, L. O. Composição centesimal e escore de aminoácidos em três espécies de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill., *P. bleo* de Candolle e *P. pereskia* (L) Karsten), **Boletim SBCTA**, Campinas, v, 25, n, 1, p, 7-12, 1991.
- ALBUQUERQUE, P. M. **Estudo da produção de proteína microbiana a partir do bagaço de maçã**, Florianópolis: Curso de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2003, 103 f, Dissertação (Mestrado).
- ALMEIDA FILHO, J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do "Ora-Pro-Nobis", **Revista Ceres, Viçosa**, MG, v, 21, n, 114, p, 105-111, 1974.
- ALMEIDA, M, E. F.; JUNQUEIRA, A. M. B.; SIMÃO, A. A.; CORRÊA, A. D. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nóbis, **Biosci. Journal**, v, 30, n, 1, p, 431-439, 2014.

- ALSULTAN, W.; VADAMALAI, G.; KHAIRULMAZMI, A.; SAUD, H.M.; AL-SADI, A.M.; RASHED, O.; JAAFFAR, A.K.M.; NASEHI, A. Isolation, identification and characterization of endophytic bacteria antagonistic to *Phytophthora palmivora* causing black pod of cocoa in Malaysia. **European Journal of Plant Pathology**, v. 155, p. 1077-1091, 2019.
- ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante in vitro em substratos orgânicos. **Revista Química Nova**, v. 33, n.10, p. 2202-2210, 2010.
- AMARAL, T. N.; JUNQUEIRA, L. A.; ALVES, C. C. O; OLIVEIRA, N.L.; PRADO, M.E.T.; RESENDE, J. V. Extraction of hydrocolloids from *Pereskia aculeata* Miller: reuse of process residue as activated carbon for the pigment-removal phase, **Food Science and Technology**, v, 1, n,1, p, 1-9, 2017.
- AMUDHA, P.; JAYALAKSHMI, M.; PUSHPABHARATHI, N.; VANITHA, V. Identification of bioactive components in *Enhalus acoroides* seagrass extract by gas chromatography–mass spectrometry. **Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research**, v. 11, p. 2455-3891, 2018.
- AOAC - *Association of Official Analytical Chemists*. Official Methods of Analysis, 2010.
- ATTARD, T. M. et al. Supercritical extraction of waxes and lipids from biomass: A valuable first step towards an integrated biorefinery, **Journal of Cleaner Production**, v, 177, p, 684–698, 2018.

- AZMIR, J, et al. Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review, **Journal of Food Engineering**, v, 117, n, 4, p, 426–436, 2013.
- BARBALHO, S. M. et al. Pereskia aculeata Miller Flour: Metabolic Effects and Composition, **Journal of Medicinal Food**, v, 19, n, 9, p, 890–894, 2016.
- BARROS NETO, B., BRUNS, R. R., & SCARMINIO, I. S. (2010). How to Experiment -Science and Industry Applications. São Paulo: Bookman.
- BARROS, K. N.; GUIMARÃES, H. E, T.; SARTOR, C. F. P.; CORTEZ, L. E. R.; AMARAL, V.; FELIPE, D. F. **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.
- BARZOTTO I.L.M, SANTOS K.A, DA SILVA E.A, SENE, A.C, DA SILVA N.S, VIEIRA L., Supercritical extraction of Eugenia involucrata leaves: influence of operating conditions on yield and α -tocopherol content, **The Journal of Supercritical Fluids**, (2018).
- BENÍTEZ, R., IBARZ, A., & PAGAN, J. Hidrolizados de proteína: procesos y aplicaciones. **Acta Bioquímica Clínica Latinoamericana**, 42(2), 227–236, (2008).
- BERNARDI, D. M.; PARIS, L. D.; DIETERICH. F.; SILVA. F. G. D.; BOSCOLO, W. R.; SARY. C.; SIGNOR, A.; BERTOL, T. M.; SGARBIERI, V. C. **Production of hydrolysate from processed Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) residues and assessment of its antioxidant activity**, *Food Science and Technology*, v,34, p,709-716, 2016.
- BEYOND, R.; BOND, J. S. **Proteolytic enzymes**, 2^a ed, Oxford: Oxford University Pres, 2001, p, 340.

- BLASCO, L.; DURACHER, L.; FORESTIER, J. P.; VIAN, L.; MARTI-MESTRES, G. Skin Constituents as Cosmetic Ingredients. Part III: A Molecular Modeling Study of Bio-Mimetic Monoglycerides Behavior at the Squalene-Water Interface, **Journal of Dispersion Science and Technology**, 27:6, 817-824, 2006.
- BOBO-GARCÍA, G., DAVIDOV-PARDO, G., ARROQUI, C., VÍRSEDA, P., MARÍN-ARROYO, M.R., Navarro, M. Intra-laboratory validation of microplate methods for total phenolic content and antioxidant activity on polyphenolic extracts, and comparison with conventional spectrophotometric methods. **J. Sci. Food Agric.**, 95: 204-209, 2015.
- BRANDÃO, T. V.; CINTRA, A. C.; SOUZA, P. R.; OLIVEIRA, E. F.; OLIVEIRA, N.; CIARELLI, G.; SOUTO, R. N. M.; DOLINSKY, M. Concentration of polyphenols in pearl pineapple, silver banana, Papaya and organic and conventional watermelon. **Brazilian Journal of Health Review**, v. 3, n. 5, p. 15092-15108, 2020.
- BRASIL, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, **Alimentos regionais brasileiros**, Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica, 2.Ed.- Brasília: Ministério da Saúde, 2015, 484 p.
- BRUFAU, G.; CANELA, A. M.; RAFECAS, M. Phytosterols physiologic and metabolic aspects related to cholesterol-lowering properties, **Nutrition Research**, v, 28, n, 4, p, 217-225, 2008.
- BRUNNER, G. **Gas Extraction: an introduction to fundamentals of supercritical fluids and the application to separation processes**. New York: Springer, 386, 1994.
- CALABRO, S.; TORTOLI, M.; BAUDNER, B.C.; PACITTO, A.; CORTESE, M.; O'HAGAN, D.T.; DE GREGORIO, E.; SEUBERT, A.; WACK, A. Vaccine

Adjuvants Alum and MF59 Induce Rapid Recruitment of Neutrophils and Monocytes That Participate in Antigen Transport to Draining Lymph Nodes. **Vaccine**, 29, 1812–1823, 2011.

CANO-MEDINA, A.; JIMÉNEZ-ISLAS, H.; DENDOOVEN, L.; HERRERA, R.P.; GONZÁLEZ-ALATORRE, G.; ESCAMILLA-SILVA, E. M. Emulsifying and foaming capacity and emulsion and foam stability of sesame protein concentrates. **Food Research International**. v. 44, n. 3, p. 684– 692. 2011.

CARBAJAL, D., MOLINA, V., VALDES, S., LOURDES, A., MAS, R. Anti-ulcer Activity of Higher Primary Alcohols of Beeswax. **Pharm. Pharmacol**, 47, 731-733, 1995.

CARDOSO, R.C.; SILVA, J. A.; MELO, C. S.; NEVES, A.C.; MEDEIROS, D. F.G.; CRUZ, D. P; OLIVEIRA, M. A. D.; GOMES, P. M. G.; CARVALHO, L. A.; COSTA, D. S. G.; DMIÃO, S. T. N.; BATISTA, A. K.; MARINS, R. C.; SILVA, B. O; RABELO, A. D. A.; LIMA, I. V.; BOLINA, C. O. PANC: Aceitação de doces preparados com plantas alimentícias não convencionais durante o Sarau Cultural da UEG, In: **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG (CEPE)**, v,3, n,1, p, 1-5, 2017.

CARVALHO, E.G; SOARES, C.P; BLAU, L; MENEGON, R.F; JOAQUIM, W. M, Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates, **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v, 1, n, 1, p, 677-682, 2014.

CASTRO, R. J. S. **Experimental mixture design as a tool for proteases production by *Aspergillus niger* and obtaining of protein hydrolysates with multiple functional and biological properties**. Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas, 2013. Tese (Doutorado).

CAVALCANTI, R, N.; MEIRELES, M, A, A, **Comprehensive Sampling and Sample Preparation**, [s,l,] Elsevier, 2012.

CHALAMAIAH, M.; DINESH KUMAR, B.; HEMALATHA, R.; JYOTHIRMAYI, T, Fish protein hydrolysates: Proximate composition, amino acid composition, antioxidant activities and applications: A review, **Food Chemistry**, v,135, p,3020–3038, 2012.

CHEMAT, F., ROMBAUT N., SICAIRE, A-G., MEULLEMIESTRE, A., FABIANO-TIXIER, A-S., ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extraction of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications A Review, **Ultrasonics Sonochemistry**, 37, 540-560, 2017.

COELHO, M, S.; AQUINO, S, A.; LATORRES, J, M.; SALAS-MELLADO, M, L, M, In vitro and in vivo antioxidante capacity of chia protein hydrolysates and peptides, **Food Hydrocolloids**, v, 91, p, 19–25, 2019.

CONCEIÇÃO, M, C, **Otimização do processo de extração e caracterização da mucilagem de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)**, Tese (Doutorado), Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

CONCEIÇÃO, M. C., JUNQUEIRA, L. A., SILVA, K. C. G., PRADO, M. E. T., RESENDE, J. V. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, 40, 104-114, 2014.

COTABARREN, J,, ROSSO, A,M,, TELLECHEA, M,, GARCÍA-PARDO, J,, RIVERA, J,L,, OBREGÓN, W,D,, PARISI, M,G,, Adding value to the chia (*Salvia hispanica* L.) expeller: Production of bioactive peptides with antioxidant properties by enzymatic hydrolysis with Papain, **Food Chemistry**, 2019.

- COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents, **Clinical Microbiology Reviews**, v, 12, n,4, p,564-582, 1999.
- CRUZ, T. M.; SANTOS, J. S.; CARMO, M. A. V.; HELLSTROM, J.; PIHLAVA, J. M.; AZEVEDO, L.; GRANATO, D.; MARQUES, M. B. Extraction optimization of bioactive compounds from ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) leaves and their *in vitro* antioxidant and antihemolytic activities, **Food Chemistry**, v. 361, 2021.
- CRUZ, J.; ORTIZ, C.; GUZMAN, F.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R.; TORRES, R, Antimicrobial peptides promising compounds against pathogenic microorganisms, **Current Medicinal Chemistry**, v, 21, p, 2299-2321, 2014.
- DAWIDOWICZ, A. L. et al. Application of PLE for the determination of essential oil components from *Thymus vulgaris* L, **Talanta**, v, 76, n, 4, p, 878–84, 15 ago, 2008.
- DAYRELL, M, S, **Extração e estudo do valor nutritivo de proteínas de folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill)**, 106 f, Tese (Doutorado em Ciências) –Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1977.
- DIAS, A. L. B., SERGIO, C. S. A., SANTOS, P., BARBERO, G. F., REZENDE, C. A., MARTÍNEZ, J. Ultrasound-assisted extraction of bioactive compounds from dedo de moça pepper (*Capsicum baccatum* L.): Effects on the vegetable matrix and mathematical modeling. **Ultrasonics Sonochemistry**, 34, 540-560, 2017.
- DUARTE, M, R; HAYASHI, S,S, Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill (Cactacea), **Revista Brasileira de Farmacognosia**, 15(2), 103-109, 2005.

- DUPUIS, M.; MCDONALD, D.M.; OTT, G. Distribution of Adjuvant MF59 and Antigen GD2 after Intramuscular Injection in Mice. **Vaccine**, 18, 434–439, 1999.
- EFTHYMIPOULOS, I.; HELLIER, P.; LADOMMATOS, N.; RUSSO-PROFILE, A.; EVELEIGH, A.; ALIEV, A.; KAY, A.; MILLS-LAMPTEY, B. Influence of solvent selection and extraction temperature of lipids extracted from spent coffee grounds. **Industrial Crops and Products**, v. 119, p. 49-56, 2018.
- ELLAIAH, P, SRINIVASULU, B, ADINARAYANA, K, A review on microbial alkaline proteases, **J Sci Ind Res**, v, 61, p, 690-704, 2002.
- EPAMIG. **Epamig desenvolve tecnologia que potencializa a produção de ora-pro-nobis**, 2021. Disponível em: <http://www.agricultura.mg.gov.br/index.php/ajuda/story/4147-epamig-desenvolve-tecnologia-que-potencializa-a-producao-de-ora-pro-nobis>
- ESPINOZA-QUIÑONES, F. R.; MÓDENES, A.N.; DE PAULI, A.R.; PALÁCIO, S.M, Analysis of Trace Elements in Groundwater Using ICP-OES and TXRF Techniques and Its Compliance with Brazilian Protection Standards, **Water Air Soil Pollut**, v, 226, n, 32, p, 1-12, 2015.
- FARAGO, P.V.; TAKEDA, I. J. M.; BUDEL, J. M.; DUARTE, M. R. Análise Morfo-anatômica de Folhas de *Pereskia grandifolia* Haw, Cactaceae, **Acta Farm, Bonaerense**, v, 23, n, 3, p, 323-327, 2004.
- FERNÁNDEZ-ARCHE, A., MARQUEZ-MARTÍNA, A., VAZQUEZ, R. L. P., PERONA, J. S., TERCENIO, C., PEREZ-CAMINO, C., RUIZ-GUTIERREZA, V. Long-chain fatty alcohols from pomace olive oil modulate the release of proinflammatory mediators, **Journal of Nutritional Biochemistry**, 20, 155–162, 2009.

FREITAS, P. H. S.; ALMEIDA, N. P.; MONTEIRO, L. C.; EVANGELISTA, M. R.; CONEGUNDES, J. L. M.; MACIEL, M. S. F.; PINTO, N.C. C.; SCIO, E. Extratos glicólicos de “ora-pro-nobis” (*Pereskia aculeata* Miller): Avaliação do teor de compostos fenólicos e do potencial antioxidante, **Brazilian Journal of Health Review**, v.4, n.1. p.1748-1760, 2021.

GABBIATTI, G,C; MARQUES, A,C,R; SANTIAGO, M,P; SARTOR, C,F,P; AMARAL, V, Estudo da ação hipolipidêmica e hipoglicêmica do extrato bruto de *Pereskia aculeata* em ratos, **VII Encontro Internacional de Produção Científica**, v, 1, n, 1, p, 1-5, 2011.

GARCIA, B,H; KRAUSS, L,A; SARTOR, C,F,P; FELIPE, D,F, Estudo da atividade antioxidante dos extratos de própolis e *Pereskia aculeata*, **VII Encontro Internacional de Produção Científica**, v, 1, n, 1, p, 1-6, 2011.

GARCIA, J, A, A.; CORRÊA, R, C, G.; BARROS, L, PEREIRA, C.; ABREU, R, M, V.; ALVES, M, J.; CALHELHA, R, C.; BRACHT, A.; PERALTA, R, M.; FERREIRA, I, C,F,R, Phytochemical profile and biological activities of 'Ora-pro-nobis' leaves (*Pereskia aculeata* Miller), an underexploited superfood from the Brazilian Atlantic Forest, **Food Chemistry**, V, 294, p, 302–308, 2019.

GARCIA, J. A. A., ANGELO, I. C., CORRÊA, R. C. G., VIEIRA, T. F., CORREA, V. G., BRACHT, A., PERALTA, R. M. Total phenolic content and antioxidant potential of ‘ora-pro-nobis’ leaves: an in vitro comparative study between *pereskia aculeata* miller and *pereskia grandifolia* haw, **International Journal of Development Research**, 10, (04), 35310-35314, 2020.

GARCIA-MORENO, P, J.; BATISTA, I; PIRES, C.; BANDARRA, N, M.;ESPEJO-CARPIO, F, J.; GUADIX, A.; GUADIZ, E, M, Antioxidant activity of protein hydrolysates obtained from discarded Mediterranean fish species, **Food Reserach International**, v, 65, p,469–476,2014.

- GARMUS, T.T.; PAVIANI, L.C.; QUEIROGA, C.L.; CABRAL, F.A. Extraction of phenolic compounds from pepper-rosmarin (*Lippia sidoides* Cham.) leaves by sequential extraction in fixed bed extractor using supercritical CO₂, ethanol and water solvents. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 99, p. 68-75, 2015.
- GILMARTIN, L., & JERVIS, L. Production of cod (*Gadus morhua*) muscle hydrolysates. Influence of combinations of commercial enzyme preparations on hydrolysate peptide size range. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 50(19), 5417–5423, 2002.
- GONÇALVES, G. A., CORREA, R. C., BARROS, L., DIAS, M. I., CALHELHA, R. C., CORREA, V. G., FERREIRA, I. C. Effects of in vitro gastrointestinal digestion and colonic fermentation on a rosemary (*Rosmarinus officinalis* L.) extract rich in rosmarinic acid. **Food Chemistry**, 271, 393–400, 2019.
- GRACIA, K. C.; LLANAS-CORNEJO, D.; HUSI, H. CVD and Oxidative Stress. **Journal of Clinical Medicine**, v. 6, n. 2, p. 1-22, 20 fev. 2017.
- GUEDES, A.R., DE SOUZA, A.R.C., TUROLA BARBI, R.C., NOTTAR ESCOBAR, E.L., ZANOELLO, E.F., CORAZZA, M.L. Extraction of *Synadenium grantii* Hook f. using conventional solvents and supercritical CO₂ + ethanol, **J. Supercrit. Fluids**, 160, 2020.
- GULLÓN, B., LU-CHAU, T, A., MOREIRA, M, T., LEMA, J, M., EIBES, G, Rutin: A review on extraction, identification and purification methods, biological activities and approaches to enhance its bioavailability, **Trends in Food Science & Technology**, 67, 220–235, 2017.
- HANI, N.M.; TORKAMANI, A.E.; ABIDIN, S.Z.; MAHMOOD, W. A. K.; JULIANO, P. The effects of ultrasound assisted extraction on antioxidative activity

of polyphenolics obtained from *Momordica charantia* fruit using response surface approach. **Food Bioscience**, v. 17, p. 7-16, 2017.

HANSEN, C.M. **Hansen Solubility Parameters: A User's Handbook**. 2ed. Boca Raton: CRC Press, 2007.

HAYOUNI, E. A.; ABEDRABBA, M.; BOUIX, M.; HAMDI, M, The effects of solvents and extraction method on the phenolic contents and biological activities in vitro of Tunisian *Quercuscoccifera* L, and *Juniperusphoenicea* L, fruit extracts, **Food Chemistry**, v, 105, n,3, p, 1126-1134, 2007.

HERPANDI, N. H.; ROSMA, A.; WAN, N. W. A. The Tuna Fishing Industry: A New Outlook on Fish Protein Hydrolysates. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.10, n.4, p.195–207, 2011.

HUANG, Z. R. YIN-KU LIN, Y. K., FANG, J. Y. Biological and Pharmacological Activities of Squalene and Related Compounds: Potential Uses in Cosmetic Dermatology, **Molecules**, 14, 540-554, 2009.

IBAÑEZ, E, et al, Extraction and Characterization of Bioactive Compounds with Health Benefits from Marine Resources: Macro and Micro Algae, Cyanobacteria, and Invertebrates, In: HAYES, M, (Ed.), **Marine Bioactive Compounds SE - 2**, [S,I,] Springer US, 2012, p, 55–98.

JAYAKAR, V.; LOKAPUR, V.; SHANTARAM, M. Identification of the volatile bioactive compounds by GC-MS analysis from the leaf extracts of *Garcinia cambogia* and *Garcinia indica*. **International Journal of Phytomedicines and Related Industries**, v. 12, n. 4, p. 580-590, 2020.

JOVANOVIC, A.A.; DORDEVIC, V.B.; ZDUNIC, G.M.; PLJEVLJAKUSIC, D.S.; SAVIKIN, K.P.; GODEVAC, D.M.; BUGARSKI, B.M. Optimization of the extraction process of polyphenols from *Thymus serpyllum* L. herb using

maceration, heat and ultrasound assisted techniques. **Separation and Purification Technology**, v. 179, p. 369-380, 2017.

KATAN, M, et al., Efficacy and safety of plant stanols and sterols in the management of blood cholesterol levels, **Mayo Clinic Proceedings**, Rochester, v, 78, n, 8, p, 965-978, 2003.

KATERJI, M.; FILIPPOVA, M.; DUERKSEN-HUGHES, P. Approaches and Methods to Measure Oxidative Stress in Clinical Samples: Research Applications in the Cancer Field. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2019, p. 1-29, 2019.

KATTOOR, A. J.; POTHINENI, N. V. K.; PALAGIRI, D.; MEHTA, J. L. Oxidative Stress in Atherosclerosis. **Current Atherosclerosis Reports**, v. 19, n. 11, p.1-11, 2017.

KAUSHIK, M. K., ARITAKE, K., TAKEUCHI, A., YANAGISAWA, M., URADE, Y. Octacosanol restores stressaffected sleep in mice by alleviating stress, **Scientific Reports**, 7, 8892, 2017.

KAZAMA, C, C; UCHIDA, D,T; CANZI, K,N; SOUZA, P.; CRESTANI, S; JUNIOR, A,G; JUNIOR, A,L, Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw, (Cactacea), **Journal of Ethnopharmacology**, 144(1), 86-93, 2012.

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

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. **Plantas Alimentícias não Convencionais (PANC) no Brasil**. 4. ed. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda, 2019.

- KLEIN, E, J, **Obtenção de compostos bioativos de folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* cambess,) utilizando CO₂ supercrítico e extração com solvente assistida por ultrassom**, Dissertação, UNIOESTE, Toledo-PR, p, 105, 2016.
- KOBA, K.; MATSOUKA, A.; OSADA, K.; HUANG, Y, Effect of loquat (*Eriobotya japonica*) extracts on LDL oxidation, **Food Chemistry**, v, 104, n,1, p, 308-316, 2007.
- KÖHN, C, R.; FONTOURA, A, M.; KEMPKA, A, P.; DEMIATE, I, M.; KUBOTA, E,H.; PRESTES, R, C, Assessment of different methods for determining the capacity of water absorption of ingredients and additives used in the meat industry, International, **Food Research Journal**, v, 22, n, 1, p, 356–362, 2015.
- KUMAR, N.; GOEL, N. Phenolic acids: natural versatile molecules with promising therapeutic applications. **Biotechnology Reports**, v. 24, 2019.
- LACOU, L.; LEONIL, J.; GAGNAIRE, V, Functional properties of peptides: From single peptide solutions to a mixture of peptides in food products, **Food Hydrocolloids**, v, 57, p,187-199, 2016.
- LAEMMLI, U, Cleavage os structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4, **Nature**, p, 680-685, 1970.
- LAFARGA, T.; HAYES, M. Bioactive peptides from meat muscle and by-products: generation,functionality and application as functional ingredients, **Meat Science**, v, 98 p, 227–239, 2014.
- LANG, Q.; WAI, C, M, Supercritical fluid extraction in herbal and natural product studies - A practical review, **Talanta**, v, 53, n, 4, p, 771–782, 2001.

Li, Z., Lan, Y., Miao, J., Chen, X., Chen, B., Liu, G., Wu, X., Zhu, X., Cao, Y. Phytochemicals, antioxidant capacity and cytoprotective effects of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus* Lam.) axis extracts on HepG2 cells, **Food Bioscience**, v.41, 2021.

LIMA A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.).** Tese. [Doutorado em Bromatologia] - Universidade de São Paulo; 2008.

LIU, R.; XING, L.; FU, Q.; ZHOU, G.H.; ZHANG, W.G. A review of antioxidant peptides derived from meat muscle and by-products, **Antioxidants**, V,5, n,3, p, 5-32, September, 2016.

LOPES JUNIOR, N,J; MEDEIROS, S,L,S; MOTA, K,C,N; COUTINHO, J,J,O, Utilização da parte aérea da ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill) na dieta de matrizes suínas no terço final da gestação até o primeiro dia de vida do leitão, **V Semana de Ciência e Tecnologia IFMG**, v, 1, n, 1, p,1-5, 2012.

LUCAS, A., E. OSSA, E. M. I., RINCÓN, J., BLANCO, M. A., GRACIA, I. Supercritical fluid extraction of tocopherol concentrates from olive tree leaves, **J. Supercrit. Fluids**, v. 22, 221–228, 2002.

LUCYSZYN, N.; ONO, L.; LUBAMBO, A.F; WOEHL, M.A; SENS, C.V; DE SOUZA, C.F; SIERAKOWSKI, M.R, Physicochemical and in vitro biocompatibility of films combining reconstituted bacterial cellulose with arabinogalactan and xyloglucan, **Carbohydrate polymers**, v, 151, n,1, p, 889-898, 2016.

MACIEL, V. B. V., BEZERRA, R. Q., CHAGAS, E. G. L., YOSHIDA, C. M. P., & CARVALHO, R. A. Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller): a potential

alternative for iron supplementation and phytochemical compounds.

Brazilian Journal of Food Technology, v. 24, 2021.

MALEKMOHAMMAD, K.; SEWELL, R. D. E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Antioxidants and Atherosclerosis: mechanistic aspects. **Biomolecules**, v. 9, n. 8, 301, 2019.

MALUF, J. U., FIORESE, M.L., MAESTRE, K.L., PASSOS, F. R., FINKLER, J. K., FLECK, J. F., BORBA, C. E. Optimization of the porcine liver enzymatic hydrolysis conditions. **J Food Process Eng**, e13370, 2020.

MARQUES, J.; MOHAMMAD, S.; BARBOSA JUNIOR, J. L.; BARBOSA, M. I. M. J. Propriedades funcionais e tecnológicas de hidrolisados proteicos de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* M.). In: **ANAIS DO 14 SLACA - SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, 2021, Campinas. Anais eletrônicos Campinas, Galoá, 2021. Disponível em: <<https://proceedings.science/slaca/slaca-2021/papers/propriedades-funcionais-e-tecnologicas-de-hidrolisados-proteicos-de-ora-pro-nobis--pereskia-aculeata-m--?lang=pt-br>> Acesso em: 23 Maio. 2022.

MARTELLI, F; NUNES, F. M. F. Radicais livres: em busca do equilíbrio. **Ciência e Cultura**, São Paulo, v. 66, n. 3, p. 54-57, set. 2014.

MARTIN, A,A; FREITAS, R,A; SASSAKI, G,L; EVANGELISTA, P, H, L; SIERAKOWSKI, M,R, Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*, **Food Hydrocolloids**, v, 1, n, 1, p, 20-28, 2017.

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

- MELO, D, S, et al, Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos, **Ciênc Agrotec, Lavras**, v, 31, n, 2, p, 420-8, 2007.
- MENDES, R, L, et al, Supercritical carbon dioxide extraction of compounds with pharmaceutical importance from microalgae, **Inorganica Chimica Acta**, v, 356, p, 328–334, 2003.
- MERCÊ, A. L. R., Landaluze, J. S., Mangrich, A. S., Bruno Szpoganicz, B., Sierakowski, M. R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} , **Bioresour Technol**, v, 76 n, 1, p, 29-37, 2001a.
- MERCÊ, A, L; FERNANDES, E; MANGRICH, A,S; SIERAKOWSKI, M,R; SZPOGANICZ, B, Fe (III)-galactomannan solid and aqueous complexes: potentiometric, epr spectroscopy and thermal data, **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v, 12, n, 6, p, 791-798, 2001b.
- MILHOMEM-PAIXÃO, S. S. R.; FASCINELI, M. L.; MUEHLMANN, L. A.; MELO, K. M.; SALGADO, H. L. C.; JOANITTI, G. A.; PIECZARKA, J. C.; AZEVEDO, R. B.; SANTOS, A. S., & GRISOLIA, C. K. Andiroba Oil (*Carapa guianensis* Aublet) Nanoemulsions: Development and Assessment of Cytotoxicity, Genotoxicity, and Hematotoxicity. **Journal of Nanomaterials**, v.1, 1-11. 2017.
- MOHAMMADPOUR, H., SADRAMELI, S. M., ESLAMI, F., ALI ASOODEH, A. Optimization of ultrasound-assisted extraction of *Moringa peregrina* oil with response surface methodology and comparison with Soxhlet method, **Industrial Crops & Products**, v. 131, 106-116, 2019.
- MOHANTY, B.; MULVIHILL, D, M.; FOX, P, F, Emulsifying and foaming properties of acidic caseins and sodium caseinate, **Food Chemistry**, v, 28, n, 1, p, 17-30, 1988.

MOSCA, F.; TRITTO, E.; MUZZI, A.; MONACI, E.; BAGNOLI, F.; IAVARONE, C.; O'HAGAN, D.; RAPPUOLI, R.; DE GREGORIO, E. Molecular and Cellular Signatures of Human Vaccine Adjuvants. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 105, 10501–10506, 2008.

MURAKOSHI, M., NISHINO, H., TOKUDA, A. TWASHIMA, A., JUNICHI OKUZUMIH, J., KITANO, O., IWASAKI, R. Inhibition by squalene of the tumor-promoting activity of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate in mouse-skin carcinogenesis, **Int. J Cancer**, v.52, 950-952, 1992.

MUSTAFA, A., TURNER, C. Pressurized liquid extraction as a green approach in food and herbal plants extraction: a review, **Anal. Chim. Acta**, v. 703, 8–18, 2011.

MUZAIFA, M.; SAFRIANI, N.; ZAKARIA, F. Production of protein hydrolysates from fish by-product prepared by enzymatic hydrolysis, Aquaculture, Aquarium, Conservation and Legislation International, **Journal of the Bioflux Society**, v,5, p, 36-39, 2012.

NAJAFIAN, L.; BABJI, A, S, A review of fish-derived antioxidant and antimicrobial peptides: Their production, assessment, and applications, **Peptides**, v, 33, p, 178–185, 2012.

CLSI, **Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically**; Approved Standard—Sixth Edition, NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4), NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2003.

NELSON, D,L.; COX, M,M, Lehninger **Princípios de Bioquímica**, 3 ed, São Paulo: Editora Sarvier, 2002, 975p.

OGUNLESI, M., OKIEI, W., OFOR, E., OSIBOTE, A. E. Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* Linn (Euphorbiaceae), a

potential medication for asthma, **African Journal of Biotechnology**, vol. 8 (24), pp. 7042-7050, 2009.

OHTA, Y. OHASHI, K., MATSURA, T., TOKUNAGA, K., KITAGAWA, A., YAMADA, K. Octacosanol attenuates disrupted hepatic reactive oxygen species metabolism associated with acute liver injury progression in rats intoxicated with carbon tetrachloride, **J. Clin. Biochem. Nutr.**, v. 42, 118-125, 2008.

OKIYAMA, D.C.G., SOARES, I.D., CUEVAS, M.S., CREVELIN, E.J., MORAES, L.A.B., MELO, M.P., OLIVEIRA, A.L., RODRIGUES, C.E.C. Pressurized liquid extraction of flavanols and alkaloids from cocoa bean shell using ethanol as solvent, **Food Res Int**, 114, 20–29, 2018.

ORMEÑO, E.; GOLDSTEIN, A.; NIINEMETS, Ü, Extracting and trapping biogenic volatile organic compounds stored in plant species, **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v, 30, n, 7, p, 978–989, jul, 2011.

PALSIKOWSKI, P. A., BESEN, L. M., SANTOS, K. A., SILVA, C., SILVA, E. A. Supercritical CO₂ oil extraction from *Bauhinia forficata* link subsp. *pruinosa* leaves: Composition, antioxidant activity and mathematical modeling, **J. of Supercritical Fluids**, v. 153, 104588, 2019.

PASUPULETI V, K; BRAUN S. State of the art manufacturing of protein hydrolysates, In: PASUPULETI VK, DEMAIN AL, **Protein hydrolysates in biotechnology**, New York: Springer Dordrec., p,11-32, 2010.

PELO, S.P.; ADEBO, O.A.; GREEN, E. Chemotaxonomic profiling of fungal endophytes of *Solanum mauritianum* (alien weed) using gas chromatography high resolution time-of-flight mass spectrometry (GC-HRTOF-MS). **Metabolomics**, v. 17, n. 43, 2021.

- PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A.; Supercritical fluid extraction of bioactive compounds: Fundamentals, applications and economic perspectives. **Food Bioprocess Technol.**, v.3, 340, 2010.
- PEREIRA, P. M. C. C., VICENTE, A. F. R. B. Meat nutritional composition and nutritive role in the human diet, **Meat Science**, v. 93, 586-592, 2013.
- PÉREZ-JIMÉNEZ J, SAURA-CALIXTO F. Effect of solvent and certain food constituents on different antioxidant capacity assays. **Food Res Int**, v.39, p.791-800, 2006.
- PINTO, N. C. C., & SCIO, E. The biological activities and chemical composition of *Pereskia* species (Cactaceae)-A review. **Plant Foods for Human Nutrition**, 69(3), 189–195, 2014.
- PINTO, N, A, V, D, et al, Variabilidade da composição centesimal, vitamina c, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott), **Rev Bras Agrociência**, Pelotas, v,7, n, 3, p, 205-8, 2001.
- PINTO, N, C, C., DUQUE, A, P, N., PACHECO, N, R., MENDES, R, F., MOTTA, E, V, S., BELLOZI, P, M, Q., RIBEIRO, A., SALVADOR, M, J., & SCIO, E, (2015), *Pereskia aculeata*: a plant food with antinociceptive activity, **Pharmaceutical Biology**, 53(12), 1780-1785, 2015.
- PINTO, N,C,C; CASSINI-VIEIRA, P; SOUZA-FAGUNDES, E,M; BARCELOS, L,S; CASTAFIORI, M,C,M; SCIO, E, *Pereskia aculeata* Miller leaves accelerate excisional wound healing in mice, **Journal of ethnopharmacology**, v, 1, n, 1, p, 131-136, 2016.
- PINTO, N,C,C; DUQUE, A, P,N; PACHECO, N,R; MENDES, R,F; MOTTA, E,V,S; BELLOZI, P,M,Q; RIBEIRO, A; SCIO, E, Atividade antinociceptiva da partição hidrometanólica do extrato bruto das folhas de *Pereskia aculeata* Miller, **Webnode**, v, 1, n, 1, p, 1-3, 2006.

PINTO, N,C,C; DUQUE, A,P,N; PACHECO, N,R; MENDES, R,F; MOTTA, E,V,S; BELOZZI, P,M,Q; RIBEIRO, A; SALVADOR, M,J; SCIO, E, *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity, **Pharmaceutical biology**, v, 1, n, 1, p, 1780-1785, 2015.

PINTO, N,C,C; SANTOS, R,C; MACHADO, D,C; FLORÊNCIO, J,R; FAGUNDES, E,M,S; ANTINARELII, L,M,R; COIMBRA, E,S; RIBEIRO, A; SCIO, E, Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller, **Pharmacology online**, v, 1, n, 1, p, 63-69, 2012.

PIZZINO, G; IRRERA, N.; CUCINOTTA, M.; PALLIO, G.; MANNINO, F.; ARCORAZI, V.; SQUADRITO, F.; ALTAVILLA, D.; BITTO, A. Oxidative Stress: Harms and Benefits for Human Health. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, p.1-13, 2017.

POMPEU, D, G,, CARVALHO, A, D, S,, COSTA, O, F,, GALDINO, A, S,, BONOTO, D, G,, SILVA, J, A.; GRANJEIRO, P, A, Fatores antinutricionais e digestibilidade “in vitro” de folhas de *Pereskia aculeata* Miller, **Biochemistry and Biotechnology Reports**, 3(1), 1-9, (2014).

QUEIROZ, C,R,A,A, **Cultivo e composição química de Ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) sob déficit hídrico intermitente no solo**, Tese (Doutorado), Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Jaboticabal, 2012.

QUEIROZ, C,R,A,A; ANDRADE, R,R; MORAIS, S,A,L; PAVANI, L,C, Growind *Pereskia aculeata* under intermitente irrigation according to levels of matric potential reduction, **Pesquisa Agropecuária Tropical, Goiânia**, v, 1, n, 1, p, 1-8, 2015.

QUEIROZ, A.; CAJAIBA, J, A sustainable process for (-)- α -bisabolol extraction from *Eremanthus erythropappus* using supercritical CO₂ and ethanol as co-solvent, **Journal of Supercritical Fluids**, v, 110, p, 39–46, 2016.

- RANG, H.P.; DALE, M, M.; RITTER, J, M, **Farmacologia**, 3ª ed, Guanabara Koogan: Rio de Janeiro, p, 692, 1997.
- RAPINEL, V.; ROMBAUT, N.; RAKOTOMANOMANA, N.; VALLAGEAS, A.; CRAVOTTO, G.; CHEMAT, F. An original approach for lipophilic natural products extraction: Use of liquefied n-butane as alternative solvent to n-hexane, **LWT - Food Science and Technology**, v.85, 2017.
- RAVELO, Y.; MOLINA, V.; CARBAJAL, D.; FERNÁNDEZ, L.; FERNÁNDEZ, J. C.; ARRUZAZABALA, M. L.; MÁS, R. Evaluation of anti-inflammatory and antinociceptive effects of D-002 (beeswax alcohols), **J Nat Med**, v.65, p.330–335, 2011.
- RE, R.; PELEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C.. Antioxidant activity applying and improved ABTS radical cation decolorization assay. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 26, n. 9/10, p. 1231-1237, 1999.
- RIERA, E, et al, Mass transfer enhancement in supercritical fluids extraction by means of power ultrasound, **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 11, n, 3–4, p. 241–244, 2004.
- ROCHA, D,R,C.; PEREIRA-JUNIOR, G,A.; VIEIRA, G.; PANTOJA, L.; SANTOS, A,S.; PINTO, N,A,V,D, Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata Miller*) desidratado, **Alimentos e Nutrição**, 19(4), 459-465, 2008.
- RODRIGUES, V. G. S. **Cultivo, uso e manipulação de plantas medicinais /** Vanda Gorete Souza Rodrigues. - Porto Velho: Embrapa Rondônia, 2004.

- RODRIGUES, A, S, **Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill,) e sua aplicação em mortadela**, p, 91, 2016.
- ROMAN, J.A.; SGARBIERI, V. Obtenção e caracterização química e nutricional de diferentes concentrados de caseína, *Revista de Nutrição*, v,18, p, 75-83, 2005.
- ROSA, S.M.; SOUZA, L.A, Morfo-anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia aculeata* Miller (Cactacea), **Acta Scientiarum, Biological Science**, 25, 415-428, 2003.
- SALVADOR , A. A. **Atividade Antioxidante e Perfil de Ácidos Graxos de Extratos da Torta de Noz Pecã (*carya illinoensis*) Obtidos por Extração Supercrítica**. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.Dissertação (Mestrado), Florianópolis-SC, 2014.
- SÁNCHEZ, A.; VAZQUEZ, A, A, Bioactive peptides: A review, **Food Quality and Safety**, v,1, p, 29–46, 2017.
- SANTOS, M. J. T. Aproveitamento de resíduos da indústria de óleos vegetais produzidos na Amazônia. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal do Pará. Instituto de Tecnologia. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2014.
- SANTOS, P.S.K.S; ORLANDELLI, F.T; FELIPE, D.F; SARTOR, C.F. cápsulas contendo a planta *Pereskia aculeata*. **VII Mostra Interna de Trabalhos de Iniciação Científica**, UNICESUMAR – Centro Universitário de Maringá – Paraná, v. 1, n. 1, p.1-5, 2014.
- SANTOS, K, A.; FILHO, O, P, A.; AGUIAR, C, M.; MILINSKI, M, C.; SAMPAIO, S, C.; PALÚ, F.; SILVA, E, A, Chemical composition, antioxidant activity

and thermal analysis of oil extracted from favela (*Cnidoscolus quercifolius*) seeds, **Industrial Crops and Products**, v, 97, p, 368–373, 2017.

SANTOS, A, Q.; SANTOS, R, X.; MARISCO, G, Atividades biológicas, toxicológicas e parâmetros nutricionais da *Pereskia aculeata* Miller: uma revisão bibliográfica, **Scientia Amazonia**, v, 7, n,2, CB1-CB16, 2018.

SANTOS, K. A.; KLEIN, E. J.; SILVA, C.; SILVA, E. A.; Cardozo-Filho, L. Extraction of vetiver (*Chrysopogon zizanioides*) root oil by supercritical CO₂, pressurized-liquid, and ultrasound-assisted methods and modeling of supercritical extraction kinetics, **J. of Supercritical Fluids**, v.150, p.30–39, 2019.

SANTOS, K. A.; KLEIN, E. J.; FIORESE, M. L.; PALÚ, F.; SILVA, C.; SILVA, E. A. Extraction of *Morus alba* leaves using supercritical CO₂ and ultrasound-assisted solvent: Evaluation of β -sitosterol content, **J. of Supercritical Fluids**, v.159, 2020.

SANTOS-SÁNCHEZ, N. F.; SALAS-CORONADO, R.; VILLANUEVA-CAÑONGO, C.; HERNÁNDEZ-CARLOS, B. Antioxidant Compounds and Their Antioxidant Mechanism, In (Ed.), **Antioxidants**. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85270>

SARAVAVAN, M.; SENTHILKUMAR, P.; KALIMUTHU, K.; CHINNADURAI, V.; VASANTHARAJ, S.; PUGAZHENDHI, A. Phytochemical and pharmacological profiling of *Turnera subulata* Sm., a vital medicinal herb, **Industrial Crops & Products**, v.124, p.822–833, 2018.

SARTOR, C.P.R.; AMARAL, V.; GUIMARÃES, H.E.T.; BARROS, K.N.; FELIPE, D.F.; CORTEZ, L.E.R.; VELTRINI, V.C. Estudo da ação cicatrizante das folhas de *Pereskia aculeata*, **Revista Saúde e Pesquisa**, 3(2), 149-154, 2010.

- SATO, R, et al, Nutritional improvement of pasta with *Pereskia aculeata* Miller: a non-conventional edible vegetable, **Food Science and Technology**, v, 39, n, suppl 1, p, 28–34, 2019.
- SCHMIDT, S.; POKORNÝ, J, Potential application of oilseeds as sources of antioxidants for food lipids-a review, **Czech Journal of Food Sciences**, v, 23, p, 93-102, 2005.
- SHAHIDI, F.; CAMARGO, A. C. Tocopherols and Tocotrienols in Common and Emerging Dietary Sources: Occurrence, Applications, and Health Benefits. **Int. J. Mol. Sci**, v.17, p.1745, 2016.
- SHARIF, K. M.; RAHMAN, M. M.; AZMIR, J.; SHAMSUDIN, S. H.; UDDIN, M.S; FAHIM, T.K.; ZAIDUL, I.S.M. Ethanol modified supercritical carbon dioxide extraction of antioxidante rich extract from *Pereskia bleo*, **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v.21, p.1314–1322, 2015.
- SHARIF, K, M, et al, Experimental design of supercritical fluid extraction - A review, **Journal of Food Engineering**, v, 124, p, 105–116, 2014.
- SHARIF, K. M; RAHMAN, M. M; ZAIDUL, I.S.M.; JANNATUL, A.; AKANDA, M. J.H; MOHAMED, A.; SHAMSUDIN, S. H. Pharmacological relevance of primitive leafy cactuses *Pereskia*, **Research Journal of Biotechnology**, v.8, p.134-142, 2013.
- SHIRSATH, S, R.; SONAWANE, S, H.; GOGATE, P, R, Intensification of extraction of natural products using ultrasonic irradiations-A review of current status, **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v, 53, p, 10–23, 2012.

- SIHVONEN, M., JARVENPAA, E., HIETANIEMI, V., HUOPALAHTI, R. Advances in supercritical carbon dioxide Technologies, **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n.6–7, p.217–222, 1999.
- SILVA, V, A.; FREITAS, A, F, R.; PEREIRA, M, S, V.; SIQUEIRA JÚNIOR, J, P.; PEREIRA, A, V.; HIGINO, J, S, Avaliação in vitro da atividade antimicrobiana do extrato da *Lippia sidoides* Cham, sobre isolados biológicos de *Staphylococcus aureus*, **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v, 12, n, 4, p, 452-455, 2010.
- SILVA, D.O; SEIFERT, M.; NORA, F. R; BOBROWSKI, V.L; FREITAG, R.A; KUCERA, H. R; NORA, L.; GAIKWAD, N. W, Acute Toxicity and Cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a Highly Nutritious Cactaceae Plant, **Journal of medicinal food**, v, 1, n, 1, p, 403-409, 2017.
- SILVA, T, C, et al, Fish protein hydrolysate in diets for Nile tilapia post-larvae, **Pesquisa Agropecuaria Brasileira**, v, 52, n, 7, p, 485–492, 2017b.
- SILVA, R. O.; SOUSA, F. B. M.; DAMASCENO, S. R. B.; CARVALHO, N. S.; SILVA, V. G.; OLIVEIRA, F. R. M. A.; SOUSA, D. P.; ARAGÃO, K. S.; BARBOSA, A. L. R.; FREITAS, R. M.; MEDEIROS, J. V. R. **Fundamental and Clinical Pharmacology**, v.28, 455, 2014.
- SIM, Y. Y.; ONG, W. T. J.; NYAM, K. L. Effect of various solvents on the pulsed ultrasonic assisted extraction of phenolic compounds from *Hibiscus cannabinus* L. leaves, **Industrial Crops & Products**, V.140, 2019.
- SINGH, H. Milk protein products: functional properties of milk proteins, In **Encyclopedia of dairy sciences**, Edited by John WF, Patrick FF, Paul LHM, Academic Press; p,887-893, 2011.
- SIRIKHANSAENG, P.; TANEE, T.; SUDMOON, R.; CHAVEERACH, A. Major Phytochemical as γ -Sitosterol Disclosing and Toxicity Testing in *Lagerstroemia* Species. **Hindawi**, v. 2017, 2017.

- SMALLWOOD, M. J.; NISSIM, A.; KNIGHT, A. R.; WHITEMAN, M.; HAIGH, R.; WINYARD, P. G. Oxidative stress in autoimmune rheumatic diseases. **Free Radical Biology And Medicine**, v. 125, p. 3-14, 2018.
- SMITH, T. J.; YANG, G.Y.; SERIL, D. N.; LIAO, J.; KIM, S. Inhibition of 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanoneinduced lung tumorigenesis by dietary olive oil and squalene, **Carcinogenesis**, v.19, n.4, p.703–706, 1998.
- SONI, H., MALIK, J., SINGHAI, A. K., SHARMA, S. Antimicrobial and anti-inflammatory activity of the hydrogels containing rutin delivery, **Asian Journal of Chemistry**, 25, 8371–8373, 2013.
- 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.
- SOUZA, L, F.; BARROS, I, B,I.; MANCINI, E.; MARTINO, L.; SCANDOLERA, E.; FEO, V, Chemical composition and biological activities of the essential oils from two *Pereskia* Species grown in Brazil, **Natural Product Communications**, V,9, n, 12, p, 1805-1808, 2014.
- SOUZA, R. M. F.; LIRA, C. S.; RODRIGUES, A. O.; MORAIS, S. A. L.; QUEIROZ, C. R. A. A.; CHANG, R.; AQUINO, F. J. T.; MUÑOZ, R. A. A.; OLIVEIRA, A. Antioxidant activity of ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) Leaves extracts using spectrophotometric and voltammetric assays *in vitro*. **Biosci. J.**, v. 30, p. 448-457, 2014b.
- SOUZA, L,F; CAPUTO, L; BARROS, I,B,I; FRATIANNI, F; NAZZARO, F; FEO, V, *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities, **International Journal Of Molecular Sciences**, v, 17, n, 9, p, 1-5, 2016c.

- SOUZA, M,R,M; MILAGRES, C,S,F; PEREIRA, R,G,F; PINTO, C,L,O; CAIXETA, G,Z,T; PEREIRA, P,R,G, Perfil de produção e comercialização do ora-pro-nobis em dois contextos regionais de Minas Gerais: perspectivas de agregação de valor, **Revista Brasileira de Agropecuária Sustentável**, v, 6, n, 4, p, 45-50, 2016a.
- SOUZA, M,S,S; BARBALHO, S,M; GULGUER, E,L; ARAÚJO, A,C; BUENO, P,C,S; FARINAZZI-MACHADO, F,M,V; LIMA, L,M,L; SILVA, B,C; MENDES, C,G, Effects of *Pereskia aculeata* Miller on the biochemical profiles and body composition of wistar rats, **Journal of Biosciences and medicines**, v, 1, n, 1, p, 82-89, 2015.
- SPARKS, D.; HERNANDEZ, R.; ZAPPI, M.; BLACKWELL, D.; FLEMING, T, Extraction of rice bran oil using supercritical carbon dioxide and propane, **Journal of the American oil chemists Society**, v, 83, p, 885-891, 2006.
- STEVIIGNY, C.; ROLLE, L.; VALENTINI, N.; ZEPPA, G, Optimization of extraction of phenolic content from hazelnut shell using response surface methodology, **J. Sci. Food Agric.** 87, 2817–2822, 2007.
- SUCUPIRA, N. R.; SILVA, A. B.; PEREIRA, G.; COSTA, J. N. Métodos Para Determinação da Atividade Antioxidante de Frutos, **UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde**, v.14, n.4, p.263-9, 2012.
- TAKEITI, C.Y.; ANTONIO, G.C.; MOTTA, E.M.; COLLARES-QUEIROZ, F.P.; PARK, K.J, Nutritive evaluation of non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller), **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, 60(1), 148-160, 2009.
- TAVARES, D. G.; BARBOSA, B. V. L.; FERREIRA, R. L.; DUARTE, W. F.; CARDOSO, P. G. Antioxidant activity and phenolic compounds of the

extract from pigment-producing fungi isolated from Brazilian caves, **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v.16, p. 148-154, 2018.

TAYLOR, J. C.; RAPPORT, L.; LOCKWOOD, G. B. Octacosanol in Human Health, **Nutrition**, v.19, p.192–195, 2003.

TEMELLI, F., GUCLU-USTUNDAG, O. Supercritical Technologies for Further Processing of Edible Oils. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products**. John Wiley & Sons, Inc, 2005.

TETALI, S. D. Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use, **Planta**, v. 249, p. 1–8, 2019.

TORRES, T. M. S.; ÁLVAREZ-RIVEIRA, G.; MAZUTTI, S.; SÁNCHEZ-MARTINEZ, J.D.; CIFUENTES, A.; IBÁÑEZ, E.; FERREIRA, S. R. S. N. Neuroprotective potential of extracts from leaves of ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*) recovered by clean compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, 179, 2021.

TORRES, T. M. S.; MENDIOLA, J. A.; ÁLVAREZ-RIVEIRA, G.; MAZUTTI, S.; IBÁÑEZ, E.; CIFUENTES, A.; FERREIRA, S. R. S. N. Protein valorization from ora-pro-nobis leaves by compressed fluids biorefinery extractions **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, 76, 2022.

TRABULSI, L, R.; ALTERTHUM, F.; GOMPERTZ, O, F.; CANDEIAS, J, A, N, **Microbiologia**, 3ª ed, São Paulo, Atheneu, 1999.

VARGAS, A, G, **Influência da sazonalidade na composição química e nas atividades antioxidante e antimicrobiana das folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller)**, UTFPR, Pato Branco, Dissertação (Mestrado), 2017.

- VASAPOLLO, G, et al, Innovative supercritical CO₂ extraction of lycopene from tomato in the presence of vegetable oil as co-solvent, **Journal of Supercritical Fluids**, v, 29, n, 1–2, p, 87–96, 2004.
- VERMELHO, A.; TERMIGNONI, C.; MACEDO, A.; BRANDELI, A.; BON, E, **Enzimas Queratinolíticas: Aplicações Biotecnológicas**, In: BON, E, P.; FERRARA, M, A, e CORVO, M, L, (Ed.), *Enzimas em Biotecnologia*, Rio de Janeiro: Interciência, v,1, p,506, 2008.
- VILKHU, K, et al, Applications and opportunities for ultrasound assisted extraction in the food industry - A review, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v, 9, n, 2, p, 161–169, 2008.
- VILLAMIL, O.; VÁQUIRO, H.; SOLANILLA, J. F. Fish viscera protein hydrolysates: Production, potential applications and functional and bioactive properties, **Food Chemistry**, v, 224, p,160-171, 2017.
- WANG, L.; WELLER, C.L. Recent advances in extraction of nutraceuticals from plants, **Trends in Food Science & Technology**, v, 17, p, 300–312, 2006.
- WANG, T. LIU, Y. Y. WANG, X. YANG, N. ZHU, H. B. ZUO, P. P. Protective effects of octacosanol on 6-hydroxydopamine-induced Parkinsonism in rats via regulation of ProNGF and NGF signaling **Acta Pharmacologica Sinica**, v.31, p.765, 2010.
- WANG, Y. ZHANG, H. WANG, Z. GENG, Z. LIU, H. YANG, H. SONG, P. LIU, Q. Anti-parkinsonian effects of octacosanol in 1-methyl-4-phenyl-1,2,3,6 tetrahydropyridine-treated mice. **Neural Regeneration Research**, v.7, p.1873, 2012.
- WHITAKER, R, **Principles of Enzymology for Food Science**, Marcel Decker, N,Y,, 1994.

- YARIBEYGI, H.; ATKIN, S. L.; SAHEBKAR, A. A review of the molecular mechanisms of hyperglycemia-induced free radical generation leading to oxidative stress. **Journal of Cellular Physiology**, v. 234, n. 2, p. 1300-1312, 2018.
- YU, Z., YIN, Y., ZHAO, W., CHEN, F., & LIU, J. Application and bioactive properties of proteins and peptides derived from hen eggs: opportunities and challenges, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 94(14), 2839–2845, 2014.
- ZAPPI, D.; TAYLOR, N, *Cactaceae in Flora do Brasil 2020 em construção*, Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Disponível em: <<http://reflora.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1633>>, Acesso em: 21 Fev, 2018.
- ZHAO, W.; SHISHDCURA, A, Fractional Extraction of Rice Bran Oil with Supercritical Carbon Dioxide pretreatment readily impairs the quality of from the, **Agricultural and Biological Chemistry ISSN:**, v, 51, n, 7, p, 1773–1777, 1987.

APÊNDICE

Tabela 4.17- Análise de variância do planejamento experimental 2³ da extração assistida por ultrassom para a variável resposta ABTS

Fonte de variância	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F _{calc}	F _{tab}
Modelo	6	5911,07	985,18	0,74	6,16
Resíduos	4	5301,83	1325,46		
Falta de ajuste	2	2595,87	1297,93		
Erro puro	2	2705,97	1352,98		
Total	10	11212,91			

R²=0,5271

Tabela 4.18- Análise de variância do planejamento experimental 2³ da extração assistida por ultrassom para a variável resposta Compostos fenólicos

Fonte de variância	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F _{calc}	F _{tab}
Modelo	6	587,19	97,86	1,02	6,16
Resíduos	4	382,27	95,57		
Falta de ajuste	2	302,99	151,50		
Erro puro	2	79,28	39,64		
Total	10	969,46			

R²=0,6056

Tabela 4.19- Análise de variância do planejamento experimental 2³ da extração assistida por ultrassom para a variável resposta ABTS

Fonte de variância	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F _{calc}	F _{tab}
Modelo	3	8835,17	2945,06	1,18	9,28
Resíduos	3	7462,60	2487,53		
Falta de ajuste	1	7441,07	7441,07		
Erro puro	2	21,52	10,76		
Total	6	16297,77			

R²=0,5421

Tabela 4.20- Análise de variância do planejamento experimental 2³ da extração supercrítica para a variável resposta Compostos fenólicos

Fonte de variância	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F _{calc}	F _{tab}
Modelo	3	5,04	1,68	0,62	9,28
Resíduos	3	8,18	2,73		
Falta de ajuste	1	6,49	6,49		
Erro puro	2	1,69	0,84		
Total	6	13,22			

R²=0,3814

Tabela 4.21- Análise de variância do planejamento experimental 2^3 da extração supercrítica para a variável resposta DPPH

Fonte de variância	Graus de liberdade	Soma dos quadrados	Média dos quadrados	F_{calc}	F_{tab}
Modelo	3	69,14	23,05	1,45	9,28
Resíduos	3	47,53	15,84		
Falta de ajuste	1	47,52	47,52		
Erro puro	2	0,02	0,01		
Total	6	116,68			

$R^2=0,5926$