

ATIVIDADE ANTIOXIDANTE DE EXTRATOS DE FOLHAS DE ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* Mill.) USANDO MÉTODOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS E VOLTAMÉTRICOS *IN VITRO*

ANTIOXIDANT ACTIVITY OF ORA-PRO-NÓBIS (*Pereskia aculeata* Mill.) LEAVES EXTRACTS USING SPECTROPHOTOMETRIC AND VOLTAMMETRIC ASSAYS *IN VITRO*

Raquel M. F. SOUSA¹; Camila S. LIRA²; Amanda O. RODRIGUES²; Sérgio A. L. MORAIS³; Carla R. A. A. QUEIROZ³; Roberto CHANG⁴; Francisco J. T. AQUINO⁴; Rodrigo A. A. MUÑOZ⁴; Alberto de OLIVEIRA^{4*}

1. Doutoranda, Instituto de Química-UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 2. Graduada, Instituto de Química-UFU, Uberlândia, MG, Brasil; 3. Professora, Instituto Federal do Triângulo Mineiro-IFTM, Uberlândia, MG, Brasil; 4. Professor, Instituto de Química-UFU, Uberlândia, MG, Brasil. alberto@iqifu.ufu.br.

RESUMO: Atualmente tem crescido a busca por plantas como fontes naturais de antioxidantes. Plantas com esta propriedade podem ser utilizadas para melhorar a qualidade de alimentos, seja para fins nutritivos ou de conservação, como também para a prevenção de doenças relacionadas ao aparecimento de radicais livres. A *Pereskia aculeata* Mill. (Ora-pro-nóbis) é uma espécie da família Cactaceae e suas folhas são consumidas por muitas pessoas. Neste contexto, este trabalho estudou o teor de fenóis totais (método Folin-Ciocalteu) e de proantocianidinas (vanilina sulfúrica), correlacionando-os com a atividade antioxidante (radical DPPH, sistema β -caroteno/ácido linoleico e voltametria por pulso diferencial) de extratos em acetona 80%, etanol 70% e água das folhas da espécie *P. aculeata* Mill., apresentando o extrato em acetona 80% maior teor de fenóis totais e proantocianidinas. Com relação à atividade antioxidante frente ao radical DPPH, o extrato em acetona 80% se apresentou ligeiramente melhor que o em etanol 70%. A técnica de voltametria por pulso diferencial mostrou que o extrato em acetona 80% apresenta constituintes com maior potencial redutor que o extrato em etanol 70%. Os dados obtidos a partir da voltametria corroboram com os resultados obtidos pelo método tradicional de DPPH. Os extratos em etanol 70% e em água apresentaram melhor atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, o que sugere a presença de outra classe de compostos que atuam na inibição do β -caroteno. Portanto, as folhas da espécie *Pereskia aculeata* podem ser consideradas como fonte potencial de compostos antioxidantes.

PALAVRAS-CHAVE: Ora-pro-nóbis. *Pereskia aculeata* Mill. DPPH. β -caroteno. Voltametria por pulso diferencial. Proantocianidinas. Fenóis totais.

INTRODUÇÃO

Antioxidantes são substâncias que podem prevenir, impedir ou reduzir danos oxidativos ao DNA, as proteínas e aos lipídeos. Eles atuam como sequestradores de espécies reativas de oxigênio (ERO) nocivas causadoras da iniciação ou progressão de doenças (DIPLOCK et al., 1998), constituindo-se em importantes compostos na prevenção de distúrbios causados por reações com radicais livres que se encontram em excesso como doenças cardíacas, arteriosclerose, alguns tipos de câncer, Alzheimer e diabetes (TAKAO et al., 1994, VALKO et al., 2006, GONENC et al., 2011, VERA-RAMIREZ et al., 2011). Além disso, por retardarem a oxidação, podem ser utilizados como conservantes para inibir ou reduzir a oxidação lipídica de alimentos, em ração animal e outros produtos, como os cosméticos (RAMALHO; JORGE, 2006).

Nos últimos anos tem aumentado o uso de antioxidantes sintéticos, como por exemplo o hidroxibutiltolueno (BHT) e o hidroxibutilanisol (BHA), na indústria alimentícia. O consumo excessivo destas substâncias pode ser responsável pelo aumento de lesões no fígado e aparecimento de carcinomas (GRICE, 1988). Portanto, para reduzir a incidência de doenças relacionadas aos radicais livres, uma solução seria suplementar a dieta com compostos antioxidantes contidos em fontes naturais presentes em frutas e vegetais. As classes de compostos naturais com elevado potencial antioxidante são os ácidos fenólicos, flavonóides e compostos polifenólicos. A presença de grupos fenólicos nestes compostos promove a estabilização de radicais livres devido as estruturas de ressonância que podem ser formadas, por isso apresentam elevada atividade antioxidante (GHASEMZADEH; GHASEMZADEH, 2011).

Em algumas espécies da família Cactaceae foram identificadas a presença de compostos fenólicos e atividade antioxidante, como por exemplo a *Hylocereus sp.* (MOHD ADZIM KHALILI; CHE ABDULLAH; ABDUL MANAF, 2012), frutos de *Opuntia spp.* (YAHIA; MONDRAGON-JACOBO, 2011) e de *Opuntia joconostle* (OSORIO-ESQUIVEL et al., 2011) e caule de *Opuntia monacantha* (VALENTE et al., 2010). Dentre as espécies da família Cactaceae, o gênero *Pereskia* tem mostrado que alguns indivíduos apresentam compostos com atividade antioxidante como os frutos de *Pereskia aculeata* Mill. (AGOSTINI-COSTA et al., 2012), as folhas de *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (BAKHARI et al., 2010, ER; LEE; RADHAKRISHNAN, 2010, SIM; SRI NURESTRI; NORHANOM, 2010a) e de *Pereskia grandifolia* Haw. (SIM; SRI NURESTRI; NORHANOM, 2010b).

Dentre as espécies do gênero *Pereskia*, destaca-se a espécie *Pereskia aculeata* Mill., conhecida popularmente como “ora-pro-nobis” no Brasil. A *P. aculeata* é oriunda de regiões tropicais e subtropicais como Brasil, África do Sul e Argentina (PATERSON; DOWNIE; HILL, 2009), sendo suas folhas consumidas por muitas pessoas na alimentação (SIERAKOWSKI et al., 1987, DE ALMEIDA; CORRÊA, 2012). Esta espécie além de apresentar elevado teor de proteína, o seu elevado teor de mucilagem e a presença de biopolímero arabinogalactana faz com que esta planta desperte o interesse das indústrias alimentícias e farmacêuticas (CRUZ, 1995, MERCÊ et al., 2000, DUARTE; HAYASHI, 2005). Em decorrência do número limitado de trabalhos científicos a respeito de plantas deste gênero e de sua importância nutricional, este trabalho teve como objetivos quantificar o teor de fenóis totais e proantocianidinas, avaliar a atividade antioxidante pelo método de sequestro do radical livre 2,2-difenil-1-picrilidrazil (DPPH) e pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico e determinar o potencial de oxidação dos extratos através da voltametria por pulso diferencial.

MATERIAIS E MÉTODOS

Materiais e equipamentos

Foram utilizados da Vetec Química Fina Ltda (Rio de Janeiro – Brasil) os solventes químicos (grau analítico), ácido sulfúrico e carbonato de sódio. Foram utilizados da Sigma-Aldrich Brasil Ltda (São Paulo – Brasil) os padrões de ácido gálico, catequina e BHT e os reagentes DPPH, Folin-Ciocalteu, ácido linoleico, β -caroteno e

Tween-40. Foi utilizado um espectrofotômetro HITACHI modelo U-2000 e um Potenciostato Drop Sens μ Stat 200 e software Drop View 1.0.

Coleta e preparo dos extratos

As folhas da *Pereskia aculeata* Mill. foram coletadas no viveiro de plantas do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Triângulo Mineiro (IFTM), Campus Uberlândia (altitude de 633 m, latitude de 18°45'47,9" S e longitude de 48°17'20,1" W) e transportadas para o laboratório de Produtos Naturais da Universidade Federal de Uberlândia. Ramos com frutos foram coletados e registrados no Herbário da Universidade Federal de Uberlândia (número 55.887). Para a preparação dos extratos as folhas foram lavadas, secas (até umidade abaixo de 10% em estufa a 35°C) e trituradas em moinho de facas. Em seguida as folhas foram maceradas em água, etanol 70% e acetona 80% (utilizando uma proporção de 1:20, massa de folha/volume de solvente), sendo deixadas sob maceração por 5 dias e repetindo-se o processo por 4 vezes.

Determinação do teor de fenóis totais pelo método folin-ciocalteu

O procedimento para determinação de fenóis totais foi realizado segundo MORAIS et al. (2008) com algumas modificações, no qual, em tubo de ensaio foi adicionada uma alíquota de 0,5 mL de solução metanólica do extrato com concentração de 1.000 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para o extrato em água e 500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para os extratos em acetona 80% e etanol 70%, 2,5 mL de solução aquosa do reagente de Folin-Ciocalteu 10% ($v v^{-1}$) e 2 mL de uma solução aquosa de carbonato de sódio 7,5% ($m v^{-1}$). A mistura foi mantida por 5 min a 50 °C, em seguida a absorbância foi medida à 760 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se 0,5 mL de metanol para obtenção do branco. O teor de fenóis totais das amostras foi determinado pela equação da reta da curva de calibração construída com padrões de ácido gálico (10, 20, 30, 40, 50, 60, 70 e 80 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e expressos como mg de equivalente de ácido gálico (EAG) por g de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

Determinação do teor de proantocianidinas pelo método da vanilina sulfúrica

O procedimento do teor de proantocianidinas foi realizado segundo MORAIS et al. (2008) com algumas modificações, no qual em um tubo de ensaio foi adicionada uma alíquota de 2 mL de solução metanólica do extrato (700 $\mu\text{g mL}^{-1}$) e 3 mL de solução de vanilina em ácido sulfúrico

70% (5 mg mL⁻¹). A mistura foi mantida por 15 min a 50 °C, em seguida, a absorbância foi medida em 500 nm. O mesmo procedimento foi realizado utilizando-se 2 mL de metanol para obtenção do branco. O teor de proantocianidinas foi determinado pela equação da reta da curva de calibração construída com padrões de catequina (1, 4, 7, 10, 13, 16, 19 e 20 µg mL⁻¹) e expressos como miligrama (mg) de equivalente de catequina (EC) por grama (g) de extrato. As análises foram realizadas em triplicata.

Análise da atividade antioxidante pelo método de sequestro de radical DPPH e cálculo do CE₅₀

O procedimento de atividade antioxidante foi realizado segundo MORAIS et al. (2008) com algumas modificações, no qual foram preparadas uma solução metanólica de DPPH de 35 µg mL⁻¹ (a

absorbância deve ser no máximo 0,99) e uma solução metanólica de concentração de 1.000 µg mL⁻¹ para os extratos. Estas soluções, denominadas de 100%, foram diluídas para 83, 66, 49, 32 e 25%. Em uma cubeta de quartzo foi adicionado 0,5 mL da solução do extrato (1.000 µg mL⁻¹) e 2,5 mL da solução de DPPH. A solução foi deixada em repouso no espectrofotômetro e o decréscimo da absorbância registrado no comprimento de onda de 517 nm durante 1 hora em intervalos de 5 minutos. O mesmo procedimento foi realizado para as demais diluições. O branco foi obtido através da medida da absorbância a 517 nm de uma solução contendo 0,5 mL da solução do extrato e 2,5 mL de metanol. A atividade antioxidante (AA) que corresponde à porcentagem de DPPH sequestrado foi determinada pela Equação 1:

$$AA (\%) = \{[Abs_{controle} - (Abs_{amostra} - Abs_{branco})] \times 100\} / Abs_{controle} \quad \text{Equação 1}$$

Onde Abs_{controle} é a absorbância inicial da solução metanólica de DPPH; Abs_{amostra} é a absorbância da mistura reacional (DPPH + amostra).

A medida da concentração eficiente (CE₅₀), que representa a concentração da amostra necessária para sequestrar 50% dos radicais de DPPH, foi calculada através da equação de regressão linear obtida através do gráfico das atividades antioxidantes *versus* as concentrações de extrato.

Análise da atividade antioxidante pelo método de oxidação do sistema β-caroteno/ácido linoleico

A atividade antioxidante foi determinada de acordo com o método de JAYAPRAKASHA et al. (2001). Em um béquer contendo 20 mg de ácido linoleico e 200 mg de Tween-40 foram adicionados 400 µL de uma solução 0,5 mg mL⁻¹ de β-caroteno em clorofórmio. A solução foi homogeneizada e o clorofórmio foi removido a 40 °C com o auxílio de nitrogênio gasoso. A seguir, foram adicionados

50 mL de água destilada previamente saturada de oxigênio por 30 minutos. A solução foi agitada vigorosamente por cerca de dois minutos até obter-se uma emulsão. Em tubos de ensaio contendo 0,2 mL de solução dos extratos em etanol com concentração de 3.150 ppm foram adicionados 4 mL da emulsão. Foi preparado também uma solução controle contendo 0,2 mL de etanol e 4 mL da emulsão. Uma emulsão preparada como descrita anteriormente sem β-caroteno foi utilizada como branco para as amostras e para o controle. Os tubos foram colocados em banho-maria a 50 °C e mediu-se a absorbância a 470 nm no tempo zero e a cada 15 minutos até completar 180 minutos de ensaio. O experimento foi realizado em triplicata. A atividade antioxidante (AA) que corresponde ao consumo do β-caroteno foi determinada pela Equação 2:

$$\text{Atividade antioxidante} = [1 - (A_0 - A_{180}) / (A_0^c - A_{180}^c)] \times 100 \quad \text{Equação 2}$$

Onde A₀ e A₀^c são valores de absorbâncias iniciais, antes da incubação, para o extrato e controle, respectivamente. A₁₈₀ e A₁₈₀^c são valores de absorbância após 180 min de incubação para o extrato e controle, respectivamente. Em todos os casos a absorbância do branco foi descontada.

Análise do potencial de oxidação através da voltametria por pulso diferencial

O potencial de oxidação dos extratos foi avaliado por voltametria por pulso diferencial utilizando um potenciostato Drop Sens µStat 200, uma célula eletroquímica contendo um sistema com três eletrodos (trabalho, referência e auxiliar) e software Drop View 1.0 para a aquisição dos dados. O eletrodo de trabalho utilizado foi o de carbono

vítreo (diâmetro de 1,5 mm), o de referência de Ag/AgCl (saturado em KCl) e o auxiliar um fio de platina. O eletrólito utilizado constituiu-se de 10 mL de solução tampão acetato 0,2 mol L⁻¹, contendo KCl 0,5 mol L⁻¹ como eletrólito suporte. Utilizou-se 1 mL de solução de extrato de concentração de 1000 ppm. A velocidade de varredura de 25 mV s⁻¹ com faixa de potencial entre -0,3 a 1,0 V foi aplicada.

Análise estatística

Neste trabalho foi utilizado o método da Análise de Variância (ANOVA) para avaliar os resultados obtidos, sendo considerados estatisticamente diferentes aqueles que apresentaram nível de significância menor que 5% ($P < 0,05$). Foi utilizado o teste de Tukey para determinar as diferenças significativas entre as médias. Todas as análises foram realizadas usando o programa BioEstat 5.3.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os extratos das folhas de *P. aculeata* foram preparados em água, etanol 70% e acetona 80%, com rendimentos de 17, 16 e 14%, respectivamente.

O extrato aquoso foi escolhido pelo fato de que na cultura popular normalmente se faz uso de chás a base de água no tratamento de enfermidades e os extratos em acetona 80% e etanol 70% uma vez que a utilização desses solventes foi reportada como eficiente na extração de compostos fenólicos e antocianidinas (JAYAPRAKASHA; SINGH; SAKARIAH, 2001).

Estudos relacionando a quantificação de fenóis totais com a atividade antioxidante já foram realizados com folhas e galhos da *Pereskia bleo* (BAKHARI et al., 2010) e folhas de *Pereskia grandifolia* (SIM; SRI NURESTRI; NORHANOM, 2010b) (Tabela 1). Nesta tabela verifica-se que quanto maior a quantidade de fenóis totais, maior é a atividade antioxidante (menor é o valor de CE_{50}).

Tabela 1. Fenóis totais e atividade antioxidante das espécies *Pereskia bleo* e *Pereskia grandiflora*.

| Espécie | Parte da planta/solvente | Fenóis Totais | Atividade antioxidante CE_{50} ($\mu\text{g/mL}$) ^c |
|------------------------------------------|--------------------------|---------------------|--------------------------------------------------------------------|
| <i>Pereskia bleo</i> ^a | Folha/metanol | 101,47 ^c | 42,32 |
| | Galho/metanol | 9,8 ^c | 60,74 |
| <i>Pereskia grandifolia</i> ^b | Folha/acetato de etila | 45,99 ^d | 140 |
| | Folha/hexano | 19,08 ^d | 285 |

^a(BAKHARI et al., 2010); ^b(SIM; SRI NURESTRI; NORHANOM, 2010b); ^cmg de equivalente em catequina por g de material seco; ^dmg de equivalente em ácido gálico por g de extrato; ^eDPPH

Para a quantificação dos compostos fenólicos foi utilizado o método de Folin-Ciocalteu. Esta técnica envolve a redução do reagente de Folin-Ciocalteu (mistura dos ácidos fosfomolibdico $\text{H}_3\text{P}(\text{Mo}_3\text{O}_{10})_4$ e fosfotungstístico $\text{H}_3\text{P}(\text{W}_3\text{O}_4)_{10}$) pelos compostos fenólicos presentes no extrato, resultando na formação de um complexo azul cuja intensidade aumenta linearmente a 760 nm (MALACRIDA; MOTTA, 2005, DE LIMA et al., 2007). O teor de fenóis totais foi expresso em mg de equivalente de ácido gálico por g de extrato

($\text{EAG}/g_{\text{extrato}}$). Quanto maior este valor, maior o teor de fenóis totais. A quantificação dos extratos foi realizada através da curva de calibração do ácido gálico cuja equação é $y = 0,0108x + 0,0058$ e $R^2 = 0,9967$ (onde y é a absorbância e x a concentração de ácido gálico em $\mu\text{g mL}^{-1}$). A Figura 1A mostra os resultados obtidos para os extratos. Pela análise estatística verifica-se uma diferença significativa entre os resultados obtidos ($p < 0,01$) e que o extrato em acetona 80% apresentou maior teor de fenóis totais.

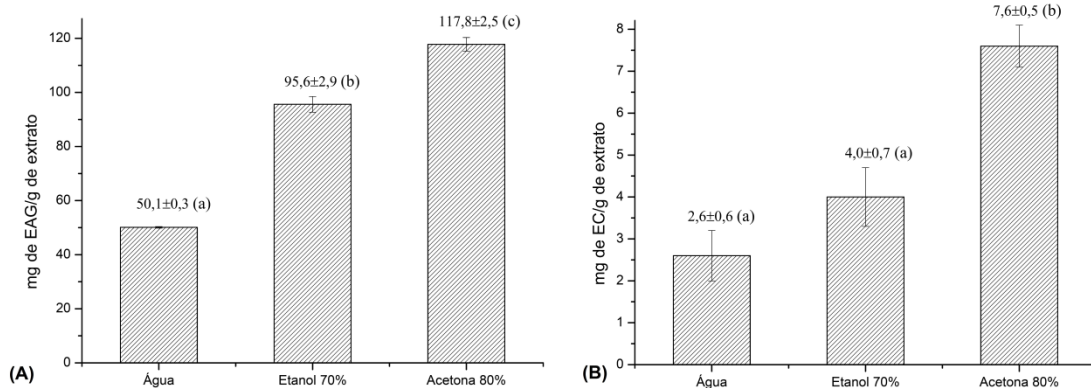


Figura 1. (A) Teor de fenóis totais e (B) Teor de proantocianidinas dos extratos das folhas de *P. aculeata*. As letras iguais indicam que não existe diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 5%. Para todas as correlações com médias diferentes se obteve $p < 0,01$.

A quantificação dos teores de proantocianidinas foi realizada pelo método da vanilina sulfúrica, através da reação de substituição eletrofílica aromática, formando um composto vermelho cuja intensidade aumenta linearmente a 500 nm (SCHOFIELD; MBUGUA; PELL, 2001). A quantidade de proantocianidinas foi dada em *mg* de equivalente de catequina por grama de extrato (EC/g_{extrato}). Quanto maior este valor, maior a quantidade de proantocianidinas. Assim, a quantificação dos extratos foi realizada através da curva de calibração da catequina cuja equação é $y = 0,0454x + 0,010$, com $R^2 = 0,998$ (onde y é a absorbância e x a concentração de catequina em $\mu\text{g mL}^{-1}$). A figura 1B mostra os resultados obtidos para os extratos. Pela análise estatística não se verifica diferença significativa entre os resultados obtidos para os extratos em água e em etanol 70%, entretanto entre o extrato em acetona 80% e em água ou em etanol 70% se verifica diferença ($p < 0,01$). Assim como os fenóis totais, o extrato em acetona 80% apresentou maior teor de proantocianidinas.

A atividade antioxidante foi avaliada pelo método espectrofotométrico de sequestro de radical DPPH, o qual se baseia na captura dos radicais por compostos presentes no extrato. Em 517 nm, o radical DPPH apresenta seu máximo de absorbância e à medida que vai sendo consumido pelos compostos presentes no extrato sua absorbância cai. Esses compostos geralmente apresentam grupos fenólicos que agem como redutores doando elétrons aos radicais, convertendo-os em compostos mais estáveis e encerrando a reação em cadeia, pois o radical formado é estabilizado por ressonância.

Segundo Reynertson et al. (2005) a intensidade da atividade antioxidante pode ser mensurada de acordo com a concentração eficiente (CE_{50}) obtida, utilizando os resultados de atividade antioxidante de diluições em série. O CE_{50} é a concentração de extrato necessária para reduzir 50% de radical DPPH e quanto menor o valor de CE_{50} maior é a atividade antioxidante. Extratos com valores de CE_{50} abaixo de $50 \mu\text{g mL}^{-1}$ indicam elevada atividade, de $50-100 \mu\text{g mL}^{-1}$ indicam moderada atividade, de $100-200 \mu\text{g mL}^{-1}$ indicam baixa atividade e acima de $200 \mu\text{g mL}^{-1}$ são considerados inativos (REYNERTSON et al., 2005). O valor de CE_{50} foi calculado a partir da equação de regressão linear (Figura 2A) obtida através do gráfico das atividades antioxidantes *versus* as concentrações de extrato. Através dos valores de CE_{50} (Figura 2B). Verifica-se que existe uma diferença significativa entre os resultados obtidos para os extratos ($p < 0,01$), portanto o extrato em acetona 80% apresentou melhor eficiência, estando dentro da faixa de elevada atividade. Embora o extrato em etanol 70% tenha apresentado um resultado estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do extrato em acetona 80%, seu valor de CE_{50} pode também ser considerado satisfatório, uma vez que se encontra dentro da faixa de atividade moderada. A Figura 2C mostra o comportamento da atividade antioxidante dos extratos na mesma concentração ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante os 60 min de ensaio. Através desta figura é possível verificar que o extrato em acetona 80% apresenta maior atividade seguido do extrato em etanol 70% e água.

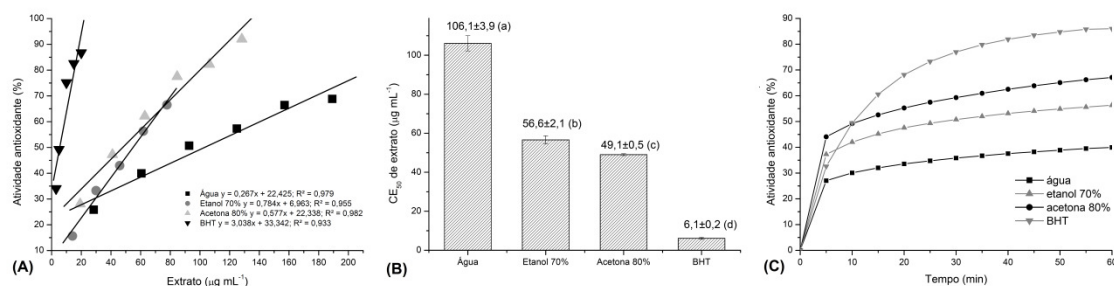


Figura 2. (A) Gráfico da atividade antioxidante (%) pelo método de sequestro do radical DPPH pela concentração dos extratos ($\mu\text{g mL}^{-1}$); (B) CE_{50} dos extratos da atividade antioxidante. As letras iguais indicam que não existe diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 5%. Para todas as correlações com médias diferentes se obteve $p < 0,01$, exceto entre o extrato em etanol 70% e acetona 80% com $p < 0,05$; (C) Gráfico da atividade antioxidante (%) dos extratos ($60 \mu\text{g mL}^{-1}$) e BHT ($15 \mu\text{g mL}^{-1}$) durante 60 min.

Analisando os valores de CE_{50} , teor de fenóis totais e proantocianidinas, verifica-se elevada correlação entre os valores encontrados. Isto sugere

que os compostos responsáveis pelo sequestro de radical DPPH apresentam grupos fenólicos em sua composição.

A atividade antioxidante também foi avaliada pelo método espectrofotométrico de sistema de co-oxidação do β -caroteno/ácido linoleico, que se baseia na inibição da oxidação do β -caroteno induzida pelos produtos de degradação do ácido linoleico, através dos compostos presentes no extrato (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). O β -caroteno apresenta absorvância máxima em 470 nm

e à medida que é consumido se observa a queda desta absorvância. Através dos resultados apresentados na Figura 3A, pode-se notar que diferentemente do DPPH, o extrato em etanol 70% apresentou maior inibição do consumo de β -caroteno em relação ao extrato aquoso e ao em acetona 80%.

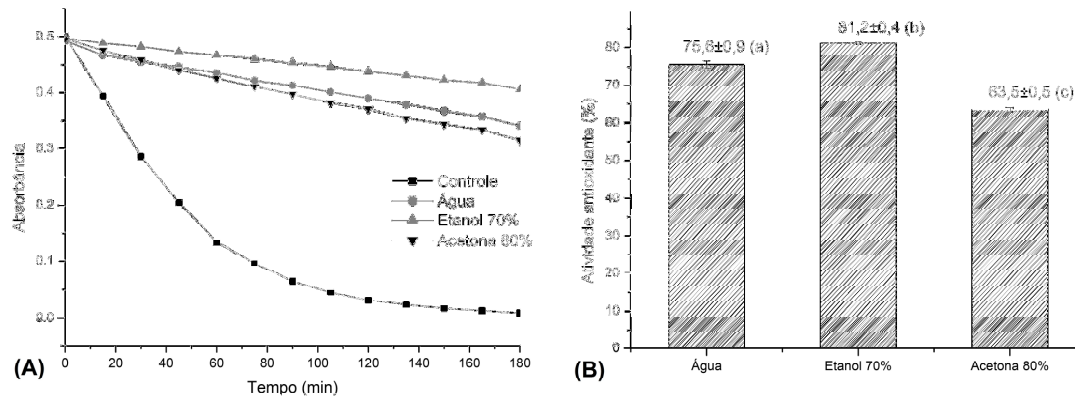


Figura 3. (A) Inibição do consumo de β -caroteno pelos produtos de oxidação do ácido linoleico ($70 \mu\text{g mL}^{-1}$); (B) Atividade antioxidante dos extratos de *P. aculeata* ($70 \mu\text{g mL}^{-1}$) pelo sistema de co-oxidação β -caroteno/ácido linoleico. As letras iguais indicam que não existe diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 5%. Para todas as correlações com médias diferentes se obteve $p < 0,01$.

Na Figura 3B estão apresentados ainda os valores da atividade antioxidante, os quais se encontram na faixa de 63,5-75,6%, existindo diferença significativa entre os resultados obtidos ($p < 0,01$), mostrando que esses extratos apresentam boa inibição da oxidação do β -caroteno.

Considerando o fato de que as atividades antioxidantes apresentadas no teste de sequestro do radical estável DPPH entre os extratos em acetona 80% e etanol 70% são próximas, pode-se dizer que o extrato em etanol 70% apresenta determinados constituintes que contribuem mais eficientemente para a inibição do β -caroteno. Além disso, devido a análise do teor de fenóis totais indicar menor concentração no extrato etanol 70% em relação ao acetona 80% ($p < 0,01$), pode-se dizer que os constituintes responsáveis pela melhor atividade do extrato etanol 70% no sistema β -caroteno/ácido linoleico não devem ser apenas os compostos fenólicos.

A atividade antioxidante dos extratos também foi avaliada por meio da determinação de seus potenciais de oxidação e das densidades de carga através do experimento de voltametria por pulso diferencial (Figura 4A). O potencial de oxidação de um composto é caracterizado como o

parâmetro de seu poder redutor, portanto quanto menor o seu potencial de oxidação maior será o seu poder redutor. Assim, compostos orgânicos que são antioxidantes podem ser chamados de agentes redutores. Desta maneira, a avaliação do poder redutor de um composto ou grupo de compostos por voltametria cíclica reflete a atividade antioxidante destes (HUANG; GAO; HAGEMAN, 2004). Na Figura 4B se encontram o potencial de oxidação (E_p) dos extratos. A densidade de carga (Q) é a área do pico de oxidação e está relacionada à quantidade de carga transferida, ou seja, Q é diretamente proporcional à quantidade de compostos que oxidam no potencial analisado. Segundo ZHANG et al. (2011), quanto maior o valor de Q , maior será a quantidade de compostos fenólicos e portanto maior a atividade antioxidante (Figura 4C).

Analisando os dados da Figura 4B se verifica que os valores de potencial são estatisticamente diferentes ($p < 0,01$), e que os extratos em água e em acetona 80% apresentaram menor potencial e, portanto os seus compostos apresentam maior poder redutor.

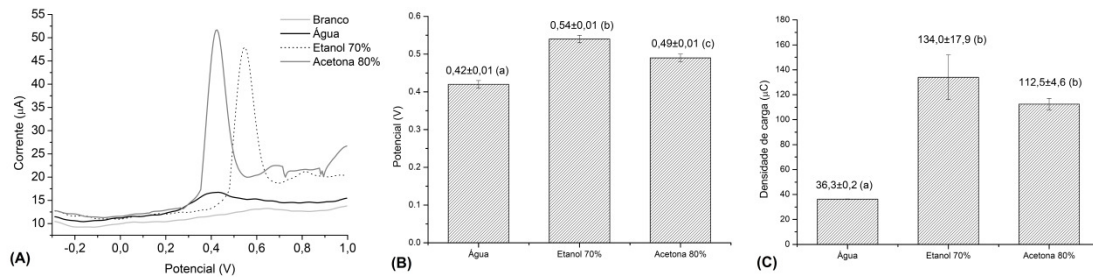


Figura 4. (A) voltamogramas, (B) potencial de oxidação, (C) densidade de carga dos extratos de *P. aculeata* obtidos por voltametria de pulso diferencial. As letras iguais indicam que não existe diferença estatística entre as médias pelo teste de Tukey a 5%. Para todas as correlações com médias diferentes se obteve $p < 0,01$, exceto em (B) entre os extratos em etanol 70% e acetona 80% e em (C) entre água e acetona 80% ambos com $p < 0,05$.

Com relação à densidade de carga (Figura 4C), verifica-se que o extrato em acetona 80% e em etanol 70% não apresentam diferenças significativas, entretanto o extrato em água é significativamente diferente dos demais ($p < 0,05$ em relação à acetona 80% e $p < 0,01$ em relação ao etanol 70%), apresentando a menor densidade de carga. Através destes resultados, sugere-se que a melhor atividade antioxidante pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico obtida pelo extrato aquoso em relação ao extrato em acetona 80% se deve a existência de compostos que atuam melhor neste sistema, mas que provavelmente não são fenólicos, uma vez que o teor de fenóis totais para este extrato é baixo. Esta observação está também de acordo com a baixa densidade de carga do extrato aquoso encontrada no experimento da voltametria, reforçando o baixo teor de fenóis totais e proantocianidinas obtidos para este extrato. Já o extrato em etanol 70% apresentou potencial de oxidação elevado, portanto menor poder redutor; e densidade de carga estatisticamente semelhante a do extrato em acetona 80%. Analisando o teor de fenóis totais, proantocianidinas e atividade antioxidante pelo sequestro do radical DPPH, o extrato em etanol 70% apresentou menor valor em relação ao em acetona 80%, e isto pode ser justificado pelo menor poder redutor encontrado na voltametria. Entretanto, o extrato em etanol 70% apresentou elevada atividade pelo sistema β -caroteno/ácido linoleico, fato que sugere também a

presença de outra classe de compostos que atua como antioxidantes, assim como no extrato em água, na inibição do β -caroteno.

CONCLUSÕES

As folhas de *Pereskia aculeata* se mostraram como uma potencial fonte de compostos antioxidantes. Este fato é de extrema relevância uma vez que ela está presente na alimentação em alguns países.

Os extratos em acetona 80% e etanol 70% apresentaram melhores resultados que a água para as análises de fenóis totais, proantocianidinas e sequestro de radical DPPH.

Em relação ao sistema β -caroteno/ácido linoleico, os extratos em água e etanol 70% foram os que apresentaram melhores resultados.

Os resultados sugerem que os dois extratos avaliados apresentam compostos diferentes dos fenólicos que contribuem para uma melhor atividade no sistema β -caroteno/ácido linoleico.

AGRADECIMENTOS

Ao Instituto de Química da Universidade Federal de Uberlândia pelo suporte de infraestrutura, a PROPP-UFU (projeto nº 011/2010), à FAPEMIG (APQ-01178-11), ao CNPq e à CAPES pelo apoio financeiro.

ABSTRACT: Currently, the search for plants as natural sources of antioxidants has been growing because they can be used to improve the nutritive or preservation properties of food, as soon as for the prevention of diseases related to free radicals. The *Pereskiaaculeata* Mill. (Ora-pro-nóbis,) is a specie of Cactaceae family and its leaves are consumed by many people. In this context, this paper studied the total phenols (Folin-Ciocalteu) and proanthocyanidins (vanillin sulfuric) correlating with the antioxidant activity (DPPH, β -carotene/linoleic acid system and differential pulse voltammetry) of extracts of 80% acetone, 70% ethanol and water of *Pereskiaaculeata* Mill. leaves. The 80% acetone extract showed higher total phenols and proanthocyanidins. Regarding to the antioxidant activity by DPPH radical scavenger, the 80% acetone extract was slightly better than 70% ethanol extract. The differential pulse voltammetry

technique displayed that the 80% acetone extract presented constituents with greater reducing potential than the ones presented in 70% ethanol extract, what can corroborate the results obtained. The 70% ethanol and water extracts has shown better antioxidant activity by β -carotene/linoleic acid system, what probably suggests the presence of another compounds classes that are responsible for the inhibition the β -carotene. Therefore, the *Pereskiaaculeata* Mill. showed that its leaves may be considered as a potential source of antioxidant compounds.

KEYWORDS: Ora-pro-nobis. *Pereskia aculeata* Mill. DPPH. β -carotene. Differential pulse voltammetry. Proanthocyanidins. Total phenols.

REFERÊNCIAS

- AGOSTINI-COSTA, T. D. S.; WONDRACECK, D. C.; ROCHA, W. D. S.; SILVA, D. B. D. Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 34, n. 1, p. 234-238, 2012.
- BAKHARI, N. A.; ABDULLAH, A. R.; OSMAN, H.; NORDIN, N. H. The relationship between phenolic, tannin and flavonoid content with the antioxidant activity of *Pereskia bleo* (Kunth). In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON SCIENCE AND SOCIAL RESEARCH, 2010. Kuala Lumpur. 2010. p. 494-498. Disponível em <http://ieeexplore.ieee.org/stamp/stamp.jsp?tp=&arnumber=5773828>. Acesso em 5 out. 2012.
- CRUZ, G. L. **Dicionário das plantas úteis do Brasil**. 5 ed. Rio de Janeiro: Bertrand Brasil, 1995, 600p.
- DE ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilization of cacti of the genus *pereskia* in the human diet in a municipality of Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, p. 751-756, 2012.
- DE LIMA, S. R.; DE OLIVEIRA, G. S.; DE MORAIS, S. A. L.; DO NASCIMENTO, E. A.; CHANG, R. Estudo dos constituintes macromoleculares, extrativos voláteis e compostos fenólicos da madeira de candeia - *Moquinia polymorpha* (LESS.) DC. **Ciência Florestal – Revista da Universidade Federal de Santa Maria**, Santa Maria, v. 17, n. 2, p. 145-155, 2007.
- DIPLOCK, A. T.; CHARLEUX, J. L.; CROZIER-WILLI, G.; KOK, F. J.; RICE-EVANS, C.; ROBERFROID, M.; STAHL, W.; VIÑA-RIBES, J. Functional food science and defence against reactive oxidative. **British Journal of Nutrition**, Cambridge, v. 80, n. S1, p. S77-S112, 1998.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M.; DOS SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Evaluation of the antioxidant activity using the β -carotene/linoleic acid system and the DPPH scavenging method. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, 2006.
- DUARTE, M. R.; HAYASHI, S. S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill. (Cactaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 2, p. 103-109, 2005.
- ER, H. M.; LEE, H. L.; RADHAKRISHNAN, A. K. Antiproliferative and antioxidant properties of leaf extracts of *Pereskia bleo* (Cactaceae) and their ability to limit natural and oxidant-induced apoptotic cell death. **Journal of Science and Technology in the Tropics**, Selangor Darul Ehsan, v. 6, n. 1, p. 31-38, 2010.
- GHASEMZADEH, A.; GHASEMZADEH, N. Flavonoids and phenolic acids: Role and biochemical activity in plants and human. **Journal of Medicinal Plant Research**, Lagos, v. 5, n. 31, p. 6697-6703, 2011.
- GONENC, A.; HACIŞEVKI, A.; GRIFFITHS, H. R.; TORUN, M.; BAKKALOGLU, B.; SIMSEK, B. Free radical reaction products and antioxidant capacity in beating heart coronary artery surgery compared to conventional bypass. **Biochemistry**, Moscow, v. 76, n. 6, p. 677-685, 2011.
- GRICE, H. C. Safety evaluation of butylated hydroxyanisole from the perspective of effects on forestomach and oesophageal squamous epithelium. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 26, n. 8, p. 717-723, 1988.

- HUANG, T.; GAO, P.; HAGEMAN, M. J. Rapid screening of antioxidants in pharmaceutical formulation development using cyclic voltammetry-potential and limitations. **Current Drug Discovery Technologies**, Sharjah, v. 1, n. 2, p. 173-179, 2004.
- JAYAPRAKASHA, G. K.; SINGH, R. P.; SAKARIAH, K. K. Antioxidant activity of grape seed (*Vitis vinifera*) extracts on peroxidation models *in vitro*. **Food Chemistry**, Berlin, v. 73, n. 3, p. 285-290, 2001.
- MALACRIDA, C. R.; MOTTA, S. Compostos fenólicos totais e antocianinas em suco de uva. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 659-664, 2005.
- MERCÊ, A. L. R.; LANDALUZE, J. S.; MANGRICH, A. S.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWSKI, M. R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} . **Bioresource Technology**, Barking, v. 76, n. 1, p. 29-37, 2000.
- MOHD ADZIM KHALILI, R.; CHE ABDULLAH, A. B.; ABDUL MANAF, A. Total antioxidant activity, total phenolic content and radical scavenging activity both flesh and peel of red pitaya, white pitaya and papaya. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 4, n. 2, p. 113-122, 2012.
- MORAIS, S. A. L.; AQUINO, F. J. T.; NASCIMENTO, E. A.; OLIVEIRA, G. S.; CHANG, R.; SANTOS, N. C.; ROSA, G. M. Análise de compostos bioativos, grupos ácidos e da atividade antioxidante do café arábica (*Coffea arabica*) do cerrado e de seus grãos defeituosos (PVA) submetidos a diferentes torras. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 5, p. 198-207, 2008.
- OSORIO-ESQUIVEL, O.; ALICIA-ORTIZ-MORENO; ÁLVAREZ, V. B.; DORANTES-ÁLVAREZ, L.; GIUSTI, M. M. Phenolics, betacyanins and antioxidant activity in *Opuntia joconostle* fruits. **Food Research International**, Ottawa, v. 44, n. 7, p. 2160-2168, 2011.
- PATERSON, I. D.; DOWNIE, D. A.; HILL, M. P. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. **Biological Control**, San Diego, v. 48, n. 1, p. 84-91, 2009.
- RAMALHO, V. C.; JORGE, N. Antioxidantes utilizados em óleos, gorduras e alimentos gordurosos. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, n. 4, p. 755-760, 2006.
- REYNERTSON, K. A.; BASILE, M. J.; KENNELLY, E. J. Antioxidant potential of seven myrtaceous fruits. **Ethnobotany Research & Applications**, Honolulu, v. 3, p. 25-35, 2005.
- SCHOFIELD, P.; MBUGUA, D. M.; PELL, A. N. Analysis of condensed tannins: a review. **Animal Feed Science and Technology**, Amsterdam, v. 91, n. 1-2, p. 21-40, 2001.
- SIERAKOWSKI, M. R.; A. J. GORIN, P.; REICHER, F.; CORRES, J. B. C. Some structural features of a heteropolysaccharide from the leaves of the cactus *Pereskia aculeata*. **Phytochemistry**, Oxford, v. 26, n. 6, p. 1709-1713, 1987.
- SIM, K. S.; SRI NURESTRI, A. M.; NORHANOM, A. W. Phenolic content and antioxidant activity of crude and fractionated extracts of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, Lagos, v. 4, n. 5, p. 193-201, 2010a.
- SIM, K. S.; SRI NURESTRI, A. M.; NORHANOM, A. W. Phenolic content and antioxidant activity of *Pereskia grandifolia* Haw. (Cactaceae) extracts. **Pharmacognosy Magazine**, Mumbai, v. 6, n. 23, p. 248-254, 2010b.

TAKAO, T.; KITATANI, F.; WATANABE, N.; YAGI, A.; SAKATA, K. A simple screening method for antioxidants and isolation of several antioxidants produced by marine-bacteria from fish and shellfish.

Bioscience Biotechnology and Biochemistry, Tokyo, v. 58, n. 10, p. 1780-1783, 1994.

VALENTE, L. M. M.; DA PAIXÃO, D.; DO NASCIMENTO, A. C.; DOS SANTOS, P. F. P.; SCHEINVAR, L. A.; MOURA, M. R. L.; TINOCO, L. W.; GOMES, L. N. F.; DA SILVA, J. F. M. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). **Food Chemistry**, Berlin, v. 123, n. 4, p. 1127-1131, 2010.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VERA-RAMIREZ, L.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C.; RAMIREZ-TORTOSA, C. L.; GRANADOS-PRINCIPAL, S.; LORENTE, J. A.; QUILES, J. L. Free radicals in breast carcinogenesis, breast cancer progression and cancer stem cells. Biological bases to develop oxidative-based therapies. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, Amsterdam, v. 80, n. 3, p. 347-368, 2011.

YAHIA, E. M.; MONDRAGON-JACOBO, C. Nutritional components and anti-oxidant capacity of ten cultivars and lines of cactus pear fruit (*Opuntia* spp.). **Food Research International**, Ottawa, v. 44, n. 7, p. 2311-2318, 2011.

ZHANG, D.; CHU, L.; LIU, Y.; WANG, A.; JI, B.; WU, W.; ZHOU, F.; WEI, Y.; CHENG, Q.; CAI, S.; XIE, L.; JIA, G. Analysis of the antioxidant capacities of flavonoids under different spectrophotometric assays using cyclic voltammetry and density functional theory. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 59, n. 18, p. 10277-10285, 2011.