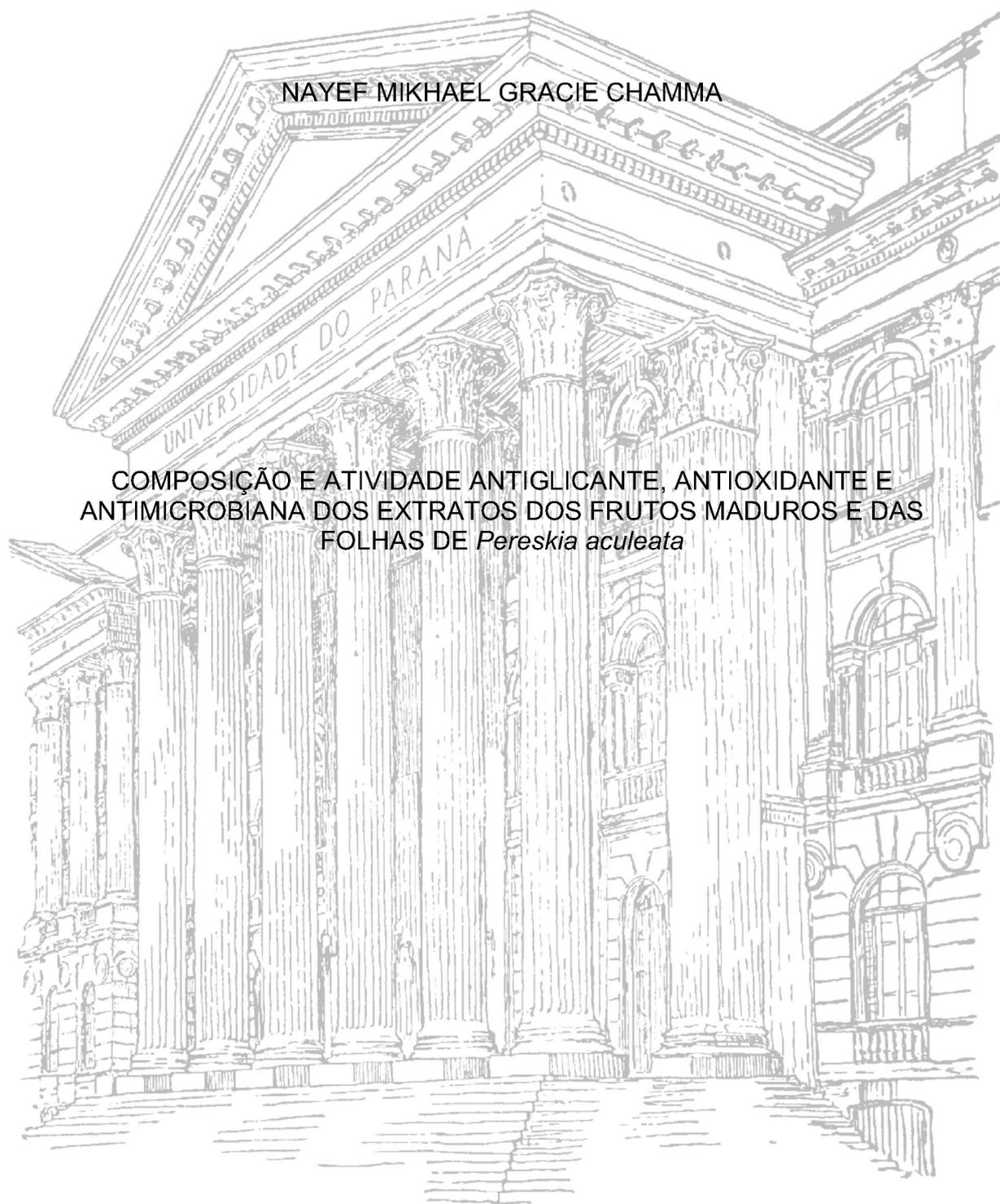


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NAYEF MIKHAEL GRACIE CHAMMA

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIGLICANTE, ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DOS FRUTOS MADUROS E DAS
FOLHAS DE *Pereskia aculeata*



CURITIBA
2024

NAYEF MIKHAEL GRACIE CHAMMA

COMPOSIÇÃO E ATIVIDADE ANTIGLICANTE, ANTIOXIDANTE E
ANTIMICROBIANA DOS EXTRATOS DOS FRUTOS MADUROS E DAS
FOLHAS DE *Pereskia aculeata*

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos, Setor de Tecnologia da Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a Dr^a Maria Lucia Masson

CURITIBA
2024

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SISTEMA DE BIBLIOTECAS – BIBLIOTECA CIÊNCIA E TECNOLOGIA

Chamma, Nayef Mikhael Gracie

Composição e atividade antiglicante, antioxidante e antimicrobiana dos extratos dos frutos maduros e das folhas de *Pereskia aculeata*. / Nayef Mikhael Gracie Chamma. – Curitiba, 2024.

1 recurso on-line : PDF.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Lucia Masson.

1. Ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata*). 2. Polifenóis. 2. Oxidação. 3. Sacarídeos. I. Universidade Federal do Paraná. II. Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos. III. Masson, Maria Lucia. IV. Título.

Bibliotecária: Roseny Rivelini Morciani CRB-9/1585



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA DE
ALIMENTOS - 40001016019P6

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação ENGENHARIA DE ALIMENTOS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **NAYEF MIKHAEL GRACIE CHAMMA** intitulada: **Composição e atividade antiglicante, antioxidante e antimicrobiana dos extratos dos frutos maduros e das folhas de *Pereskia aculeata***, sob orientação da Profa. Dra. MARIA LUCIA MASSON, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 15 de Março de 2024.

Assinatura Eletrônica

18/04/2024 17:47:59.0

MARIA LUCIA MASSON

Presidente da Banca Examinadora

Assinatura Eletrônica

24/04/2024 13:54:03.0

LUIZ GUSTAVO LACERDA

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE ESTADUAL DE PONTA GROSSA)

Assinatura Eletrônica

18/04/2024 17:42:52.0

FELIPE RICHTER REIS

Avaliador Interno (INSTITUTO FEDERAL DO PARANÁ)

Francisco Heráclito dos Santos, 100 - Centro Politécnico - CURITIBA - Paraná - Brasil

CEP 81531-980 - Tel: (41) 3361-3232 - E-mail: posalim@ufpr.br

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 358794

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://siga.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp> e insira o código 358794

AGRADECIMENTOS

Ao Universo, por viabilizar e me direcionar na realização deste trabalho e em todos os momentos da minha existência.

Aos meus familiares que me proporcionaram o apoio fundamental.

A minha orientadora, Prof^a Dr^a Maria Lucia Masson, por acreditar na minha capacidade e atuar como peça-chave na concretização desta etapa.

Aos professores do departamento de Engenharia Química, em especial Everton, Mafra, Corazza, Francini, Vitor, Luciana, Lorena e Michele, por compartilhar o conhecimento.

Aos técnicos Jair, Wanderlei, Thiago, Aline, Sheila, Dani, Cintia, Rubia, Ana, Lenzi, Pilar e Rosana, que estiveram sempre na retaguarda.

Aos professores Edileusa, Giselle, Charles, Kahlil, Aline, Daniela, Felipe, Alessandra, Bruno, Fabíola e Michel.

Aos amigos e colegas Carlos Henrique, Sandra, Mitsuka, Maurício, Fabiane, Luisa, Manuel, Isabela, Thalia, Cleber, Nayara, Raphael, Juliane, Karoline, Marciana e Helder.

Ao sr. Vilmar, por conceder as amostras das folhas e frutos de ora-pro-nóbis.

Aos laboratórios LAMEAA, LAMAQ e CROME.

À Universidade Federal do Paraná e à banca avaliadora.

À CAPES pela bolsa concedida.

A todos que de alguma forma contribuíram.

“Ora-pro-nóbis” significa rogai por nós.

RESUMO

A planta ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) é uma espécie nativa que apresenta alto valor nutricional e farmacológico. Seus frutos, ainda pouco explorados, e folhas podem ser utilizados em produtos alimentícios e farmacêuticos. Neste trabalho, foram realizadas extrações assistidas por dispersor de alto cisalhamento com proporção (m.v⁻¹) 1:20 de sólido:solvente das folhas e frutos secos em pó. A produção dos extratos secos se deu por rotaevaporação seguida de liofilização. Os resultados das análises de compostos fenólicos totais, flavonóides totais, antocianinas totais e anti-lipoxidação via ensaio TBARS apontaram melhor performance para as seguintes condições: 65°C e 10 minutos com solução hidroetanólica 70%. A recuperação das extrações foi de aproximadamente 13% para as folhas e 50% para os frutos. Foi avaliada ainda a atividade antiglicante por PAGE e MALDI-TOF através da glicação da albumina de soro bovino com frutose, e a atividade antimicrobiana via técnica de disco difusão para as cepas *S. aureus* e *E. coli*. Os extratos das folhas obtiveram melhor performance em todos os testes com resultados relevantes. A performance antiglicante e anti-lipoxidação dos extratos (1,50 mg. mL⁻¹) é significativa, sendo de aproximadamente 49% para as folhas e 35% para os frutos em relação à inibição da glicação, e 59% para as folhas e 50% para os frutos em relação à inibição da oxidação lipídica. A atividade antimicrobiana é baixa o suficiente para que não fossem visualizados halos de inibição nos testes de ambas as cepas. Os polifenóis identificados por cromatografia em fase líquida foram os ácidos gálico, clorogênico, cafeico, vanílico, cumárico e ferúlico e os flavonoides catequina, procianidina, rutina e isoquercetina. Por meio de cromatografia em fase gasosa foi possível identificar os compostos terpênicos neofitadieno e fitol. Foram encontrados resquícios de cádmio através de espectrofotometria de absorção atômica em chama. A ressonância magnética nuclear ¹H RMN HR-MAS apontou a presença de sacarose e outros carboidratos, além de proteínas e terpenos. Os espectros de massa dos extratos das folhas se mostraram mais ricos em variedade de substâncias aromáticas frente aos dos frutos.

Palavras-chave: *Pereskia aculeata* Miller; extrato seco; ora-pro-nóbis; glicação; oxidação; AGEs; polifenóis; sacarídeos.

ABSTRACT

The plant ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) is a native species that presents high nutritional and pharmacological value. Its berries, yet poorly explored, and its leaves can be used in food and pharmaceutical products. In this work, extractions assisted by a high shear disperser were carried out with a ratio (m.v⁻¹) of 1:20 of solid:solvent from the dried powder of leaves and berries. The production of the dry extracts was done in a rotary evaporator followed by freeze-drying. The results of the analyses of total phenolic compounds, total flavonoids, total anthocyanins and anti-lipoxidation via TBARS assay showed better performance for the following conditions: 65°C and 10 minutes with 70% hydroethanolic solution. The extraction yield was approximately 13% for the leaves and 50% for the berries. The antiglycation activity was carried out under bovine serum albumine-fructose assay and was evaluated via PAGE and MALDI-TOF. The antimicrobial activity was measured via disk diffusion technique for *S. aureus* and *E. coli* strains. Leaf extracts performed better in all tests with relevant results. The antiglycation and anti-lipoxidation action of the extracts (1,50 mg. mL⁻¹) is significant, being approximately 49% for leaves and 35% for berries for glycation inhibition, and 59% for leaves and 50% for berries for lipid oxidation inhibition. The antimicrobial activity is low enough that no inhibition halos could be visualized for both strains. The polyphenols identified by liquid chromatography were the acids: gallic, chlorogenic, caffeic, vanillic, coumaric and ferulic, and the flavonoids: catechin, procyanidin, rutin and isoquercetin. Through gas chromatography technique, it was possible to identify terpenes, such as neophytadiene and phytol. Remains of cadmium were found using flame atomic absorption spectrophotometry. Nuclear magnetic resonance ¹H RMN HR-MAS showed the presence of sucrose and other carbohydrates, as well as proteins and terpenes. The mass spectra of the leaf extracts were richer in variety of aromatic substances when compared to the berry.

Keywords: *Pereskia acuelata* Miller; dry extract; Barbados gooseberry; glycation; oxidation; AGEs; polyphenols; saccharides.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 - FLOR DE ORA-PRO-NÓBIS	21
FIGURA 2 - FRUTOS DE ORA-PRO-NÓBIS	23
FIGURA 3 - CLASSIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS EM ÁCIDOS FENÓLICOS (SUBCLASSIFICADOS EM ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS – CAFEICO, CAFTÁRICO, CLOROGÊNICO E FERÚLICO, E EM ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS – GÁLICO, ELÁGICO, VANÍLICO, PROTOCATECUICO, SALICÍLICO), FLAVONOIDES (SUBCLASSIFICADOS EM FLAVONAS – LUTEOLINA, APIGENINA, EM FLAVONÓIS – QUERCETINA, RUTINA E KAEMPFEROL, EM ISOFLAVONAS – GENISTEIN E DAIDZINA, EM ANTOCIANINAS – MALVIDINA E CIANIDINA, EM FLAVAN-3-OLS – CATEQUINA, GALOCATEQUINA E EPICATEQUINA, E EM FLAVANONAS – NARINGENINA E HESPERDINA) E OUTROS FENÓLICOS (LIGNANAS, ESTILBENOS, TANINOS, XANTÔNICOS, LIGNINAS E CUMARINAS).....	32
FIGURA 4 - REAÇÃO DE MAILLARD ESQUEMATIZADA	37
FIGURA 5 - PRECURSORES DA FORMAÇÃO DE AGES/ALES E ESTRUTURA DOS AGES DERIVADOS DOS AMINOÁCIDOS LISINA E ARGININA	38
FIGURA 6 - ESPÉCIES CARBÔNÍLICAS REATIVAS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E DO METABOLISMO DOS LIPÍDEOS	40
FIGURA 7 - TEOR DE AGES E ALES EM ALIMENTOS POR MÉTODOS DISTINTOS.....	47
FIGURA 8 - ALVOS DE COMBATE À GLICAÇÃO. PROTEÍNAS, FOSFOLIPÍDIOS E ÁCIDOS NUCLEICOS REAGEM COM MONOSSACARÍDEOS FORMANDO PRODUTOS DE AMADORI, OS QUAIS, POR SUA VEZ, GERAM COMPOSTOS CARBÔNÍLICOS E, POR FIM, OS AGES. O SISTEMA DE DEFESA ENDÓGENO-ENZIMÁTICO ATUA NOS PRODUTOS DE AMADORI E COMPOSTOS CARBÔNÍLICOS. OS COMPOSTOS ANTIGLICANTES ATUAM TANTO NOS PRODUTOS DE AMADORI E COMPOSTOS CARBÔNÍLICOS, QUANTO NOS	

MONOSSACARÍDEOS. OS COMPOSTOS DEGLICANTES ATUAM DIRETAMENTE NOS AGES. OS BLOQUEADORES DE SINAIS DE AGES ATUAM NAS CÉLULAS.	54
FIGURA 9 - PRINCÍPIO TBA OU TBARS, SENDO MA O ALDEÍDO, OU DIALDEÍDO, MANLÔNICO, E TBA-MA ADDUCT A REPRESENTAÇÃO DOS ADUTOS RESULTANTES	61
FIGURA 10 - DIAGRAMA DE BLOCOS DAS PRINCIPAIS ETAPAS DURANTE A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE ORA-PRO-NÓBIS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS	66
FIGURA 11 - AMOSTRAS SECAS: FRUTOS E FOLHAS, RESPECTIVAMENTE	67
FIGURA 12 - ROTA EVAPORAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE EXTRATO	70
FIGURA 13 - FRUTO ABERTO DE ORA-PRO-NÓBIS	79
FIGURA 14 - ESPECTRO DE MASSA MALDI-TOF PARA: (VERMELHO) BSA, (ROSA) BSA GLICADA COM FRUTOSE E (AMARELO) BSA GLICADA COM FRUTOSE NA PRESENÇA DE DMSO	96
FIGURA 15 - ESPECTRO DE MASSA MALDI-TOF PARA BSA GLICADA COM FRUTOSE NA PRESENÇA DE: (AZUL ESCURO) EXTRATO DOS FRUTOS 65°C/10', (VERDE) EXTRATO DOS FRUTOS 65°C/15', (AZUL CLARO) EXTRATO DAS FOLHAS 65°C/10', (VINHO) EXTRATO DAS FOLHAS 65°C/15', (CINZA) ÁCIDO ROSMARÍNICO	96
FIGURA 16 - RESULTADO PAGE DA ESQUERDA PARA A DIREITA: BSA NATIVA, BSA GLICADA, BSA GLICADA COM INTERFERÊNCIA DE DMSO, BSA GLICADA COM INTERFERÊNCIA DE ÁCIDO ROSMARÍNICO, BSA GLICADA COM INTERFERÊNCIA DO EXTRATO DO FRUTO A 65°C/10', BSA GLICADA COM INTERFERÊNCIA DO EXTRATO DA FOLHA A 65°C/10'	97
FIGURA 17 - ESTRUTURAS IDENTIFICADAS NA CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA. (1) ÁCIDO GÁLICO; (2) ÁCIDO CLOROGÊNICO; (3) ÁCIDO CAFEICO; (4) ÁCIDO VANÍLICO; (5) ÁCIDO CUMÁRICO; (6) ÁCIDO FERÚLICO; (7) CATEQUINA; (8) PROCIANIDINA; (9) RUTINA; (10) ISOQUERCETINA	100
FIGURA 18 – RESULTADOS GC-MS COM ENFOQUE NOS TERPENOS	101

FIGURA 19 - RMN DE HR-MAS PARA EXTRATO DAS FOLHAS	102
FIGURA 20 - RMN DE HR-MAS PARA EXTRATO DOS FRUTOS	103
FIGURA 21 - ESPECTROS H RMN DA REGIÃO CARACTERÍSTICA DE CARBOIDRATOS	103
FIGURA 22 - ESPECTRO H RMN DA REGIÃO DE MENOR DESLOCAMENTO QUÍMICO	104
FIGURA 23 - ESPECTRO H RMN INDICATIVO DE ANÉIS AROMÁTICOS...	104

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 – RESULTADOS ANTERIORES DA COMPOSIÇÃO BÁSICA DAS FOLHAS SECAS DE ORA-PRO-NÓBIS.....	22
TABELA 2 - RESULTADOS ANTERIORES DA COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FOLHAS DE ORA-PRO-NÓBIS.....	25
TABELA 3 - BIOATIVOS DAS FOLHAS E FRUTOS DE ORA-PRO-NÓBIS	26
TABELA 4 - TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAIS E SUAS RESPECTIVAS VANTAGENS E DESVANTAGENS	34
TABELA 5 - ATUAÇÃO DOS BIOATIVOS DURANTE AS ETAPAS DA GLICAÇÃO	50
TABELA 6 - ENZIMAS ANTIGLICANTES E DEGLICANTES.	51
TABELA 7 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE ADUTOS DE GLICAÇÃO E LIPOXIDAÇÃO	62
TABELA 8 - LISTA DE REAGENTES (CONTINUA).....	63
TABELA 9 - LISTA DE BACTÉRIAS.....	64
TABELA 10 - PARÂMETROS PARA ABSORÇÃO ATÔMICA	69
TABELA 11 - PARÂMETROS PARA CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA.	77
TABELA 12 - COMPOSIÇÃO EM BASE SECA.....	80
TABELA 13 - COMPARATIVO ENTRE FIBRAS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS... ..	80
TABELA 14 - ATIVIDADE DE ÁGUA (AW).....	82
TABELA 15 - PERFIL MINERAL	83
TABELA 16 - CONSUMO DIÁRIO IDEAL DE MINERAIS CONFORME O GÊNERO E A IDADE	85
TABELA 17 - RESULTADOS DE CONTEÚDO DE CFT E FT, E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VIA DPPH DOS EXTRATOS DAS FOLHAS SECAS DE ORA-PRO-NÓBIS OBTIDOS A PARTIR DE ESL ASSISTIDA POR DISPERSOR DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DO SOLVENTE, TEMPERATURA E TEMPO NO PROCESSO	88
TABELA 18 - RESULTADOS DE CONTEÚDO DE CFT E FT, E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VIA DPPH DOS EXTRATOS DOS FRUTOS	

SECOS DE ORA-PRO-NÓBIS OBTIDOS A PARTIR DE ESL ASSISTIDA POR DISPERSOR DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DO SOLVENTE, TEMPERATURA E TEMPO NO PROCESSO	89
TABELA 19 - RESULTADOS DE CONTEÚDO DE AT DOS EXTRATOS SECOS DE ORA-PRO-NÓBIS OBTIDOS A PARTIR DE ESL ASSISTIDA POR DISPERSOS DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO NO PROCESSO	90
TABELA 20 - RESULTADOS DE INIBIÇÃO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA DA GEMA DO OVO VIA TBARS COM EXTRATOS DE ORA-PRO-NÓBIS OBTIDOS A PARTIR DE ESL ASSISTIDA POR DISPERSOR DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO NO PROCESSO	94
TABELA 21 - RESULTADOS DE RENDIMENTO DA ESL ASSISTIDA POR DISPERSOR DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO NO PROCESSO	94
TABELA 22 - COMPARATIVO DE INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO	95
TABELA 23 - RESULTADOS DOS ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES POR ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA.....	105

LISTA DE SIGLAS

Abs	– Absorbância
ABTS	– Ácido 3-ethylbenzthiazoline-6-sulfônico
AGEs	– Produtos Finais de Glicação Avançada (<i>Advanced glycation end products</i>)
ALEs	– Produtos Finais de Lipoxidação Avançada (<i>Advanced lipoxidation end products</i>)
AT	– Antocianinas Monoméricas Totais
a_w	– Atividade de Água
BHA	– 3,3-dietil-hexano;4-metoxifenol
BHT	– 2,6-ditert-butil-4-metilfenol
BSA	– Albumina de Soro Bovino (<i>Bovine Serum Albumine</i>)
CEL	– Carboxietil-lisina
CFT	– Compostos Fenólicos Totais
CG	– Cromatografia em Fase Gasosa
CLAE	– Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência
CML	– Carboximetil-lisina
DAD	– Detector de Matriz de Diodo (<i>Diode Array Detector</i>)
DG	– 3-desoxiglicosona
DODIC	– Produto da Condensação Cruzada Entre Lisina, Arginina e 3-Desoxiglicosona
DP	– Grau de Polimerização (<i>Degree of Polymerization</i>)
DP	– Desvio Padrão
DPPH	– 1,1-difenil-2-picril-hidrazil
EAGLEs	– Produtos Finais de Glicação e Lipoxidação Avançadas (<i>Either Advanced Glycation End Products or Advanced Lipoxidation End Products</i>)
ELISA	– Teste Sorológico Imunoenzimático (<i>Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay</i>)
ERA	– Elemento Responsivo Antioxidante
EROs	– Espécies Reativas do Oxigênio
ESL	– Extração Sólido-Líquido

FAAS – Espectrofotometria de Absorção Atômica em Chama (*Flame Atomic Absorption Spectroscopy*)

FI – Fibras Insolúveis

FS – Fibras Solúveis

FT – Flavonoides Totais

GC – Cromatografia em Fase Gasosa (*Gas Chromatography*)

GLO I – Glioxalase I

GO – Glioxal

GOLD – Dímero de lisina-glioxal

HHE – 4-hidroxi-hexenal

HNE – 4-hidroxi-2-nonenal

HPLC – Cromatografia em Fase Líquida de Alta Eficiência (*High Performance Liquid Chromatography*)

LC-MS – Cromatografia em Fase Líquida Acoplada a Espectrômetro de Massas (*Liquid Chromatography-Mass Spectrometry*)

MA – Aldeído Malônico (*Malonaldehyde*)

MALDI-TOF – Ionização/Dessorção de Matriz Assistida por Laser-Tempo de Voo (*Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization-Time of Flight*)

MG – Metilglioxal

MS – Espectrômetro de Massas (*Mass Spectrometry*)

N – Nitrogênio

NADPH – Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Oxidase (*Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate Oxidase*)

PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (*Polyacrylamide Gel Electrophoresis*)

PEBD – Polietileno de Baixa Densidade

RAGE – Receptor de AGEs (*AGE Receptor*)

Re – Número de Reynolds

RMN HR-M – Ressonância Magnética Nuclear Para Sólidos

Sc – Número de Schmidt

Sh – Número de Sherwood

SOD – Superóxido Dismutase

TBARS – Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (*Thiobarbituric Acid Reactive Substances*)

- TBHQ – 2-terc-butilbenzeno-1,4-diol
- UPLC – Cromatografia em Fase Líquida de Ultra Alta Eficiência (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*)
- UV – Ultravioleta
- WB – Método Analítico *Western Blot* ou *Western Blotting*

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	OBJETIVOS	18
1.1.1	Objetivo geral	18
1.1.2	Objetivos específicos	18
2	REVISÃO DA LITERATURA	20
2.1	ORA-PRO-NÓBIS: ASPECTOS GERAIS E APLICAÇÕES	20
2.2	COMPOSTOS BIOATIVOS	27
2.2.1	Atividade antioxidante	28
2.2.2	Compostos fenólicos	31
2.3	MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS EM MATRIZES VEGETAIS	33
2.3.1	Solventes empregados na extração de biocompostos	35
2.4	REAÇÃO DE MAILLARD	35
2.4.1	Produtos finais de glicação avançada in vivo	40
2.4.2	Produtos finais de glicação avançada em alimentos	45
2.4.3	Atividade antiglicante	48
2.4.4	Técnicas analíticas relevantes	56
2.4.5	Ensaio imunológico	57
2.4.6	Ensaio bioanalítico	58
3	MATERIAL E MÉTODOS	63
3.1	MATERIAL	63
3.2	MÉTODOS	65
3.2.1	Matéria prima: obtenção e preparo	67
3.2.2	Composição centesimal	67
3.2.3	Perfil mineral	68
3.2.4	Extração dos compostos bioativos	69
3.2.5	Análise do potencial dos extratos	71
3.2.6	Análise estatística dos dados	76
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	78
4.1	COMPOSIÇÃO CENTESIMAL	78
4.1.1	Espectrofotometria de absorção atômica em chama	82

4.2	AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO.....	86
4.2.1	Seleção do solvente.....	86
4.2.2	Seleção do tempo e da temperatura.....	91
4.2.3	Atividade antiglicante.....	95
4.2.4	Atividade antimicrobiana.....	99
4.2.5	Cromatografia em fase líquida.....	100
4.2.6	Cromatografia em fase gasosa.....	101
4.2.7	Ressonância magnética nuclear para sólidos	102
5	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	106
6	CONCLUSÕES.....	107
	REFERÊNCIAS	108
	ANEXOS.....	136

1 INTRODUÇÃO

As profundas mudanças provocadas no estilo de vida pela sociedade moderna ocidental desencadearam, entre outras consequências, a prevalência de diversas doenças crônicas, como a resistência insulínica, síndromes metabólicas, obesidade, diabetes do tipo II, nefropatias, distúrbios neurológicos e cardiovasculares (URIBARRI, 2017). Estas doenças têm em comum os elevados níveis de marcadores inflamatórios e estresse oxidativo, cuja origem pode estar vinculada à combinação de múltiplos fatores à dieta, ou até mesmo, apenas à dieta por si só (RAKEL, 2002).

Dentre os inúmeros constituintes da alimentação atual que têm relação com pró-inflamação e pró-oxidação, estão os denominados produtos finais de glicação avançada ou AGEs, do inglês *advanced glycation end products*, e os produtos finais de lipoxidação avançada ou ALEs, do inglês *advanced lipoxidation end products*, ou ainda a mistura de ambos – do inglês EAGLEs *either advanced glycation or lipoxidation end products* (VISTOLI *et. al.*, 2013). Estes compostos tendem a se acumular nos tecidos ao longo dos anos e podem tanto se formar no interior do organismo, *in vivo*, quanto serem diretamente consumidos nos alimentos, sendo que, neste segundo caso, a presença de AGEs se dá devido à reação de Maillard (TREVISAN, 2015).

Esta reação não enzimática acontece entre aminoácidos e açúcares redutores durante o armazenamento e processamento térmico dos alimentos, sendo também responsável pela formação de componentes que contribuem para alguns dos aspectos desejáveis ao consumidor, como coloração e aroma (LUND *et. al.*, 2017). Vale citar que a formação de AGEs acontece até dez vezes mais em processamento térmico via calor seco, ou seja, fornos, chapas, torradeiras e fritadeiras, o que denota a importância de se diminuir a preferência por estes métodos de preparo, seja em ambiente doméstico ou industrial (TREVISAN, 2015).

Além do controle da dieta em relação ao consumo de AGEs e ALEs exógenos, incluir alimentos com propriedades antioxidantes auxilia na preservação da saúde e funcionalidade do organismo (URIBARRI, 2017). Diversos derivados de plantas já foram estudados e são consumidos hoje devido a suas propriedades, como é caso da berberina, curcumina, silimarina e ácido rosmarínico (ZYCH *et. al.*, 2020; LEKSHMI *et. al.*, 2013; SHIN *et. al.*, 2015;

YELTSIN, 2017). Diante deste cenário, foi selecionada a planta nativa brasileira ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) cujas folhas têm sido alvo de estudos recentes devido a suas propriedades nutricionais e medicinais (CONCEIÇÃO, 2013; GARCIA *et al.*, 2019; AGOSTINI-COSTA 2020). Neste trabalho, serão determinadas as condições mais adequadas para a extração sólido-líquido (ESL) assistida por dispersor de alto cisalhamento, algumas atividades biológicas dos extratos dos frutos maduros de ora-pro-nóbis e de suas folhas, bem como alguns dos componentes contribuintes para tais atividades.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

Verificar as atividades biológicas dos extratos de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) conjuntamente à composição.

1.1.1 Objetivos específicos

- Verificar a composição centesimal dos frutos maduros e folhas in natura de ora-pro-nóbis, compreendendo umidade, cinzas, lipídeos, proteínas e fibras;
- Verificar o perfil mineral dos frutos maduros e folhas secos via espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS);
- Realizar a extração sólido-líquido (ESL) assistida por dispersor de alto cisalhamento das folhas e frutos maduros secos com etanol e solução etanólica 70%;
- Determinar as condições ideais de extração: tempo, temperatura e solvente;
- Verificar a atividade antioxidante in vitro dos extratos via ensaio DPPH;
- Quantificar o teor de flavonoides totais (FT), compostos fenólicos totais (CFT) e antocianinas monoméricas totais (AT) dos extratos via espectrofotometria;
- Verificar a atividade anti-lipoxidação in vitro dos extratos via ensaio TBARS;
- Verificar a atividade antiglicante in vitro dos extratos via MALDI-TOF e PAGE;
- Medir a atividade antimicrobiana dos extratos via técnica de disco difusão;
- Caracterizar os compostos bioativos dos extratos via cromatografia em fase líquida (HPLC);

- Caracterizar os compostos bioativos dos extratos via ressonância magnética nuclear de sólidos (RMN HR-MAS);
- Caracterizar os compostos dos extratos via cromatografia em fase gasosa (GC).

2 REVISÃO DA LITERATURA

Na sequência, serão abordados os tópicos que contextualizam o presente estudo: aspectos gerais da ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller); compostos bioativos e a atividade antioxidante; métodos de extração de bioativos; a reação de Maillard, os produtos de glicação avançada e lipoxidação avançada, a atividade antiglicante e opções de técnicas para identificação.

2.1 ORA-PRO-NÓBIS: ASPECTOS GERAIS E APLICAÇÕES

A ora-pro-nobis é uma cactácea cujo nome popular vem do latim e significa rogai por nós (MADEIRA *et al.*, 2013). O nome científico foi uma homenagem ao botânico francês Nicolas-Claude Fabri de Peiresc, daí Peireskia ou *Pereskia aculeata*, cuja tradução para o português se dá como planta dotada de espinhos (CONCEIÇÃO, 2013).

Algumas características desta planta perene são (HAYASHI *et al.*, 2015; CONCEIÇÃO, 2013; MADEIRA, *et al.*, 2013; ALBUQUERQUE *et al.*, 1991; TOFANELLI *et al.*, 2011):

- Trepadeira que pode atingir até 10 metros de altura;
- Com acúleos ao longo dos ramos;
- Ramos lenhosos ou sublenhosos no terço final;
- Caules finos e com espinhos verdadeiros;
- Tronco principal contém espinhos;
- Folhas podem ter forma elíptica ou simétrica, com 15 centímetros de comprimento e 8 de largura;
- Folhas são lisas, largas, suculentas, cor verde-escuro e ainda possuem mucilagem;
- Pecíolo curto e se agrupa de duas a seis folhas em ramos laterais.

Conforme a FIGURA 1, as flores são pequenas e contêm pétalas brancas com o centro alaranjado. Já os frutos, apresentados na FIGURA 2, são pequenas bagas espinhosas amarelas, esféricas, de coloração amarela ou alaranjada quando maduros (BRASIL, 2010; MARSARO-JÚNIOR *et al.*, 2011; MADEIRA *et al.*, 2013).

FIGURA 1 - FLOR DE ORA-PRO-NÓBIS



FONTE: BRASIL, 2018.

A espécie *Pereskia aculeata* Miller é nativa do Brasil, porém não ocorre exclusivamente nesta região, podendo ser encontrada desde a Argentina até a Flórida (KINUPP *et al.*, 2014). De acordo com Zappi e colaboradores (2018), em território brasileiro, a planta é encontrada nas seguintes regiões:

- Nordeste: Alagoas, Bahia, Ceará, Maranhão, Pernambuco, Sergipe;
- Centro-Oeste: Goiás;
- Sudeste: Espírito Santo, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo;
- Sul: Paraná, Rio Grande do Sul e Santa Catarina.

Os ambientes propícios para o desenvolvimento de *Pereskia aculeata* são variados, como terras áridas ou levemente áridas, os biomas do Cerrado, da Caatinga e da Mata Atlântica, restingas, afloramentos rochosos e as florestas ciliar, estacional decidual, estacional semidecidual, ombrófila ou pluvial e ombrófila mista (DUARTE *et al.*, 2005; ZAPPI, *et al.*, 2018).

Na alimentação humana, *Pereskia aculeata* faz parte do grupo das PANCs, ou seja, plantas alimentícias não convencionais, sendo que o maior consumo se dá nos estados de Minas Gerais e Goiás (BRASIL, 2015). O cultivo de ora-pro-nóbis vem acontecendo em pequena escala para uso como hortaliça, cerca viva e fins ornamentais.

Conforme apresentado pelas TABELAS 1 e 2, o interesse na produção de suas folhas desidratadas e moídas tem crescido devido à alta quantidade de proteínas, fibras, ferro, cálcio e potássio, podendo ser utilizadas para enriquecer massas de pães e biscoitos, além da comercialização direta ou em cápsulas (ROSA *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2008).

TABELA 1 – RESULTADOS ANTERIORES DA COMPOSIÇÃO BÁSICA DAS FOLHAS SECAS DE ORA-PRO-NÓBIS

PROTEÍNAS	CINZAS	LIPÍDEOS	FIBRAS	CARBOIDRATOS	REFERÊNCIA
27,79 ± 0,00	20,12 ± 0,00	-	-	-	GONÇALVES <i>et al</i> , 2015
18,30 ± 0,00	20,30 ± 0,00	4,30 ± 0,00	34,00 ± 0,00	23,10 ± 0,00	BOTREL <i>et al</i> , 2020
11,55 ± 0,00	25,69 ± 0,00	3,25 ± 0,00	11,55 ± 0,00	46,03 ± 0,00	VARGAS <i>et al</i> , 2017 ^{IN}
17,91 ± 0,00	22,67 ± 0,00	3,48 ± 0,00	17,91 ± 0,00	48,47 ± 0,00	VARGAS <i>et al</i> , 2017 ^{VE}
24,17 ± 0,00	17,83 ± 0,00	3,71 ± 0,00	-	48,39 ± 0,00	BARBALHO <i>et al</i> , 2016
20,10 ± 0,00	13,66 ± 0,00	2,07 ± 0,00	-	24,80 ± 0,00	MARTINEVISKI <i>et al</i> , 2011
28,40 ± 0,00	16,10 ± 0,00	4,10 ± 0,00	-	-	TAKEITI <i>et al</i> , 2009
14,38 ± 0,00	15,97 ± 0,00	2,54 ± 0,00	-	58,99 ± 0,00	SOUZA, 2013
22,93 ± 0,00	18,70 ± 0,00	3,64 ± 0,00	12,64 ± 0,00	36,18 ± 0,00	ROCHA <i>et al</i> , 2008
18,95 ± 0,00	17,47 ± 0,00	4,01 ± 0,00	-	-	RODRIGUES <i>et al</i> , 2015
17,40 – 25,40	14,81 ± 0,00	5,07 ± 0,00	21,60 ± 0,00	29,53 ± 0,00	CAMBRAIA <i>et al</i> , 1974
27,60 ± 0,00	15,23 ± 0,00	10,23 ± 0,00	28,70 ± 0,00	43,23 ± 0,00	SANTANA <i>et al</i> , 2018
40,68 ± 0,00	15,46 ± 0,00	5,23 ± 0,00	-	-	SOBRINHO <i>et al</i> , 2015
15,51 ± 0,24	17,25 ± 0,07	3,57 ± 0,23	50,55 ± 2,44	8,49 ± 0,97	RODRIGUES, 2016

FONTE: Adaptado de SILVA, 2019.

LEGENDA: ^{IN} Valores obtidos no inverno

^{VE} Valores obtidos no verão

Embora existam discrepâncias nos valores relatados pelas TABELAS 1 e 2, é perceptível certa tendência. Tais discrepâncias ocorrem devido à influência dos fatores relacionados ao cultivo da planta, como exposição solar, abastecimento hídrico, pH do solo, composição do solo, emprego de fertilizantes e outros (KHADER; RAMA, 2003; UUSIKU *et al*, 2010; ROHANI-GHADIKOLAEI

et al, 2012; JIMÉNEZ-AGUILAR *et al*, 2015). Vale citar ainda que a florada de ora-pro-nóbis é importante para a produção de mel, uma vez que suas flores são ricas em pólen e néctar (KAZAMA *et al.*, 2012).

Os frutos, conforme apresentado pela FIGURA 2, têm seu uso restrito por conta da presença de espinhos na superfície, embora existam variedades sem espinhos. As características de frutificação da planta são pouco conhecidas, embora se saiba que a produção de frutos costuma ser esporádica e concentrada em um breve período, normalmente de fevereiro a março e sob determinadas condições climáticas (BRASIL, 2018).

Os frutos são agradáveis ao paladar, podem ser consumidos in natura e não há relatos de fatores antinutricionais. Silva *et al.* (2012) relata que 13 acessos de *Pereskia aculeata* que floresceram nas condições do Distrito Federal, produziram frutos com pesos variáveis entre 2,6 e 11,5 gramas.

FIGURA 2 - FRUTOS DE ORA-PRO-NÓBIS



FONTE: BRASIL, 2018.

Em relação à avaliação nutricional, foi demonstrado que as folhas da espécie possuem alto teor de proteína e de lisina, um aminoácido essencial na nutrição humana. Os teores determinados de proteína bruta foram 17,4% e 25,4% em relação à matéria seca (CAMBRAIA *et al.*, 1974). Esses níveis de proteína e lisina são mais elevados do que os encontrados em hortaliças convencionais como alface, couve, repolho e espinafre (CAMBRAIA *et al.*, 1974; MORTON, 1987; ALBUQUERQUE *et al.*, 1991). De acordo com Conceição (2013), a ingestão diária de 100 gramas de folhas de ora-pro-nobis supre as necessidades de cálcio, magnésio, zinco, ferro e vitamina C. A TABELA 3 apresenta alguns compostos bioativos já quantificados nas folhas e frutos,

indicando que são fontes promissoras de outras substâncias bioativas. Conforme Agostini-Costa e colaboradores (2014), o teor de carotenoides totais verificados nas folhas variou de 119,0 a 210,0 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ enquanto nos frutos foi de 12,6 a 76,2 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$.

Além de ser utilizada como alimento, há registros do uso de *Pereskia aculeata* na medicina tradicional:

- Folhas usadas no abrandamento de processos inflamatórios (CONCEIÇÃO, 2013);
- Folhas usadas na recuperação da pele queimada (CONCEIÇÃO, 2013);
- Folhas usadas como emoliente (TELLES *et al.*, 2016);
- Frutos usados como expectorante (ROSA, *et al.*, 2003);
- Frutos usados como antissifilítico (ROSA, *et al.*, 2003).

Vale comentar que a importância da espécie na indústria farmacêutica se dá devido ao considerável teor de mucilagem (GARCIA *et al.*, 2019).

Comumente os polissacarídeos extraídos de cactáceas são descritos como ricos em arabinogalactana, composta por galactose, arabinose, ramnose e ácido galacturônico (SÁENZ *et al.*, 2004; HABIBI *et al.*, 2004). A mucilagem das folhas de ora-pro-nóbis é majoritariamente constituída por arabinogalactana (SIERAKOWSKI 1982; SIERAKOWSKI, 1988; SIERAKOWSKI *et al.*, 1987).

TABELA 2 - RESULTADOS ANTERIORES DA COMPOSIÇÃO MINERAL DAS FOLHAS DE ORA-PRO-NÓBIS

MINERAL	BOTREL et al, 2020	RODRIGUES, 2016	TAKEITI et al, 2009	CAMBRAIA et al, 1974	OLIVEIRA et al, 2013	RODRIGUES et al, 2015	CREMASCO et al, 2016
Ca	2373,39	3883,00 ± 0,03	3420,00	3400,00	2160,00	105,00	2880,00
Mg	832,25	2710,00 ± 0,20	1900,00	1500,00	680,00	-	1050,00
K	2845,64	2863,00 ± 0,10	-	-	-	-	-
P	155,00	166,00 ± 0,07	-	-	-	-	-
Fe	11,72	31,96 ± 1,49	14,18	-	9,40	-	10,60
Zn	2,47	-	26,71	-	5,90	-	4,00
Cu	2,20	-	-	-	-	-	-
Mn	64,41	-	46,40	-	2,80	-	-
Na	47,75	-	-	-	-	-	-

FONTE: Adaptado de SILVA, 2019.

NOTA: Dados em mg. 100 g de amostra seca⁻¹.

TABELA 3 - BIOATIVOS DAS FOLHAS E FRUTOS DE ORA-PRO-NÓBIS

BIOATIVO	TEOR FOLHAS ($\mu\text{g/g}$)	TEOR FRUTOS ($\mu\text{g/g}$)	REFERÊNCIA
α -caroteno	---	4,3 – 35,1	AGOSTINI-COSTA <i>et al</i> , 2014
β -caroteno	13,8 – 47,0	7,3 – 41,1	
Luteína	45,8 – 114,2	0,8 – 3,7	
Zeaxantina	>5,0	---	
Pró-vit. A (RAE/100 g)	186,0 – 375,0	79,7 – 458,0	
BIOATIVO	TEOR FOLHAS (mg/g)	REFERÊNCIA	
Ácido caftarico <i>cis</i>	9,50	GARCIA <i>et al</i> , 2019	
Ácido caftarico <i>trans</i>	2,22		
Derivado do ácido cafeico	0,57		
Quercetina-O-pentosídeo-O-rutinosídeo	2,11		
Quercetina-O-pentosídeo-O-hexosídeo	0,74		
Quercetina-3-O-rutinosídeo	3,56		
Isorhamnetina-O-pentosídeo-O-rutinosídeo	2,27		
Isorhamnetina-O-pentosídeo-O-hexosídeo	0,63		
Kaempferol-3-O-rutinosídeo	0,81		
Isorhamnetina-3-O-rutinosídeo	1,30		
Ácidos fenólicos totais	12,32		
Flavonóides totais	11,40		
Fenólicos totais	23,75		

FONTE: Adaptado de AGOSTINI-COSTA, 2020.

2.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

Compostos naturais têm sido usados globalmente por milhares de anos (FU *et al.*, 2019). Entretanto, a tendência mundial atual em direção à saúde impulsionou consideravelmente a busca por alternativas naturais que preservam a funcionalidade do organismo (FANZO *et al.*, 2020). Vários compostos sintetizados naturalmente possuem funções bioativas e têm sido explorados para diferentes aplicações, principalmente nas indústrias alimentícia e farmacêutica. Tais substâncias têm estruturas químicas que desempenham funções especializadas em nível biológico (BONILLA *et al.*, 2015).

De acordo com um consenso estabelecido por HK (2009), os compostos bioativos são componentes naturais essenciais e não essenciais que podem influenciar positivamente a saúde humana. Nutricionalmente, também são chamados de nutracêuticos desde 1979, uma vez que, quando ingeridos, proporcionam benefícios à saúde além da nutrição básica (HK *et al.*, 2009).

Os compostos bioativos compõem um conjunto altamente heterogêneo de moléculas com diferentes estruturas químicas e distribuições na natureza (CARBONELL-CAPELLA *et al.*, 2014). Em geral, esses metabólitos são divididos em três grupos principais (BONILLA *et al.*, 2015):

- Terpenos e terpenóides;
- Compostos fenólicos;
- Alcalóides.

Além destes principais, outras moléculas têm demonstrado certa bioatividade, como polissacarídeos, aminoácidos e peptídeos, indicando que a diversidade de compostos bioativos é bastante abrangente.

Os benefícios desses compostos são consequência de diversas propriedades bioativas comprovadas, principalmente efeitos antioxidantes, antiinflamatórios e antimicrobianos (BARBA *et al.*, 2014). Em geral, a maioria dos compostos bioativos tem uma capacidade antioxidante marcada devido à sua capacidade de capturar espécies reativas ou radicais livres (BARBA *et al.*, 2014). Além disso, melhoram as defesas antioxidantes endógenas do organismo, permitindo uma abordagem terapêutica atraente contra o estresse oxidativo e doenças correlatas (PUJARI *et al.*, 2014).

O papel dos bioativos nos processos inflamatórios é evidenciado pela redução de sinalizadores, como citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, interleucinas, enzimas induzíveis (ciclooxigenase-2 e óxido nítrico sintase induzível) e mediadores inflamatórios (prostaglandinas, leucotrienos e tromboxano). Estes eventos patológicos estão associados ao desenvolvimento e progressão da maioria das doenças crônicas, como Diabetes Mellitus tipo II, obesidade, câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares (DO NASCIMENTO *et al.*, 2021).

A atividade antimicrobiana de compostos bioativos tem sido relatada para diferentes microrganismos (MA *et al.*, 2016). Esta atividade é frequentemente associada a compostos fenólicos, e acredita-se que eles utilizem metais redox ativos da célula microbiana, causando um desequilíbrio no estado redox e consequentemente a morte celular (MA *et al.*, 2016).

Além dessas propriedades mencionadas, vários outros efeitos estão associados aos compostos bioativos, incluindo atividades anticancerígenas, neuroprotetoras, hepatoprotetoras, imunomoduladoras, antidiabéticas, antiinflamatórias e antimicrobianas (GUPTA *et al.*, 2021; ADEOLA *et al.*, 2021; JI, 2019; TENKERIAN *et al.*, 2015; PUJARI *et al.*, 2014; NEGI *et al.*, 2011).

2.2.1. Atividade antioxidante

Os antioxidantes ganharam tanta popularidade, principalmente por estarem envolvidos em muitos processos biológicos, como proteção dos tecidos, imunidade, saúde, manutenção da homeostase, envelhecimento, crescimento e desenvolvimento. Antioxidante foi definido como qualquer substância que atrasa, previne ou remove o dano oxidativo a uma molécula alvo. Halliwell e colaboradores (1995) e Khlebnikov e colaboradores (2007) definiram antioxidantes como "qualquer substância que elimina espécies reativas do oxigênio (EROs) ou indiretamente atua para regular as defesas antioxidantes e/ou inibir a produção de EROs". Em outras palavras, podemos definir antioxidantes como qualquer molécula que inibe a oxidação de outra molécula. Uma reação envolvendo a perda de elétrons e aumento no estado oxidativo é denominada "oxidação". A oxidação resulta na formação de radicais livres: espécies extremamente reativas e com elétrons desemparelhados capazes de

iniciar reações em cadeia que desestabilizam outras moléculas e geram mais radicais livres. Estes radicais livres também são denominados de EROs e criam desequilíbrio homeostático que origina estresse oxidativo, lesão tecidual, morte celular e patogênese (ANDONOVA et al., 2015). Os radicais livres podem ser resultantes de diversos fatores, entre os quais (OZOUGWU, 2016):

- Consequência do metabolismo aeróbico normal: aproximadamente 90% do oxigênio utilizado pela célula é consumido pelo sistema de transporte de elétrons mitocondrial;
- Ruptura oxidativa de fagócitos (glóbulos brancos) como parte do mecanismo pelo qual bactérias e vírus são mortos e pelo qual antígenos (proteínas estranhas) são desnaturados;
- Metabolismo xenobiótico, ou seja, desintoxicação de substâncias tóxicas. Consequentemente, ações como: exercícios vigorosos ou que hiperaceleram o metabolismo celular, inflamação crônica, infecções e outras doenças, síndrome do intestino permeável (*leaky gut*), exposição a alérgenos ou drogas ou toxinas (fumaça de cigarro, poluição, pesticidas e inseticidas) podem contribuir para um aumento na carga oxidante do corpo.

Vale comentar que cerca de 1 a 3% do oxigênio inspirado se converte nas EROs, dentre as quais estão o radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$), formado a partir da redução do O_2 , e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produto da redução ou dismutação do $O_2^{\bullet-}$. Ambas as formas são consideradas quimicamente reativas e, quando colocadas em contato com íons metálicos de transição (principalmente Fe e Cu), tendem a formar espécies de radicais de alta reatividade, responsáveis por gerar danos ao organismo. Além disso, durante a conversão mitocondrial de glicose em energia, também são gerados radicais livres do oxigênio (HALLIWELL, 2009; LEHNINGER; COX, 2021).

Os antioxidantes neutralizam os radicais livres doando um de seus elétrons, o que encerra a reação de captura de elétrons. O mecanismo de ação dos antioxidantes pode ser simples ou combinado, seja através da eliminação de radicais livres, atividade redutora, complexação de pró-oxidantes, eliminação de radicais peróxil lipídicos e extinção de oxigênio singlet (MEHTA et al., 2015). Há dois principais mecanismos de eliminação dos radicais livres:

- **Quebra de cadeia:** o antioxidante primário doa um elétron ao radical livre presente no sistema ou este simplesmente decai em um produto inofensivo. Esses antioxidantes têm como alvo os radicais livres e interrompem a reação em cadeia na fase de propagação da oxidação – estes compõem a maioria dos antioxidantes na indústria (LOBO *et al.*, 2010);
- **Preventivo:** estes antioxidantes bloqueiam a formação de radicais livres. Esse grupo inclui quelantes de metais, que aumentam a eficácia de antioxidantes secundários ou de terminação de cadeia. Previne a oxidação reduzindo a taxa de iniciação da cadeia, e podem prevenir a oxidação estabilizando radicais de metais de transição como cobre e ferro (SINGH *et al.*, 2013).

A identificação das vitaminas A, C e E como antioxidantes foi revolucionária e levou à percepção de que estes agentes redutores, por vezes, são capazes de eliminar EROs antes que as células sejam danificadas (JACOB, 1996; KNIGHT, 1998; WOLF, 2005). Os antioxidantes também podem ser classificados como enzimáticos ou não enzimáticos (MEHTA *et al.*, 2015):

- **Enzimáticos (endógenos):** o sistema enzimático antioxidante contribui direta e indiretamente para a defesa contra as EROs. Catalase, superóxido dismutase (SOD), glutathione redutase etc., são antioxidantes enzimáticos;
- **Não enzimáticos:** esses antioxidantes são muitos, como vitaminas (A, C, E e K), cofatores enzimáticos (Q10), minerais (Zn, Se etc.), compostos organossulfurados, compostos de nitrogênio (ácido úrico), peptídeos (glutathione) e polifenóis.

Os benefícios do consumo de alimentos ricos em antioxidantes incluem a prevenção de doenças cardíacas, proteção contra o câncer, melhora da imunidade e combate ao envelhecimento (RICE-EVANS; DIPLOCK, 1993; URIBARRI, 2017).

No final do século XIX e início do século XX, um extenso estudo foi dedicado ao uso de antioxidantes em importantes processos industriais, como a prevenção da corrosão de metais, a vulcanização da borracha e a polimerização de combustíveis na incrustação de motores de combustão interna (MATILL, 1947). Já na indústria de alimentos, o uso dos antioxidantes é fundamental por dois principais pontos:

- **Minimização das modificações estruturais das proteínas:** pode ocorrer cloração ou nitração dos aminoácidos por conta da presença de espécies reativas do oxigênio (EROs);
- **Controle da oxidação lipídica:** as EROs atacam as duplas ligações de ácidos graxos insaturados, iniciando e propagando o processo de rancificação.

Nas matrizes alimentares, as reações de oxidação são consideradas responsáveis pelos efeitos negativos, como degradação lipídica, pigmentar, nutricional e alterações organolépticas indesejáveis. O emprego de técnicas de controle das reações de oxidação é fundamental para a preservação do produto final (FENNEMA *et al.*, 2008). Para tal, são utilizados antioxidantes sintéticos na indústria de alimentos devido a suas características de alta eficiência, baixo custo e elevada estabilidade. 3,3-dietil-hexano-4-metoxifenol (BHA), 2,6-diterc-butil-4-metilfenol (BHT) e 2-terc-butilbenzeno-1,4-diol (TBHQ) são os principais exemplos de uso corriqueiro. Entretanto, pesquisas apontam que algumas espécies de antioxidantes sintéticos são responsáveis pela produção de compostos tóxicos e carcinogênicos no organismo (FENNEMA *et al.*, 2008). Há a opção de se fazer uso de substâncias naturais obtidas a partir da extração de matrizes vegetais com alto poder antioxidante e toxicidade nula. Os antioxidantes naturais, como ácido ascórbico, os carotenoides e os polifenóis são substâncias de elevado valor nutricional e que agregam qualidade ao produto final (BREWER, 2011; DEVATKAL *et al.*, 2010).

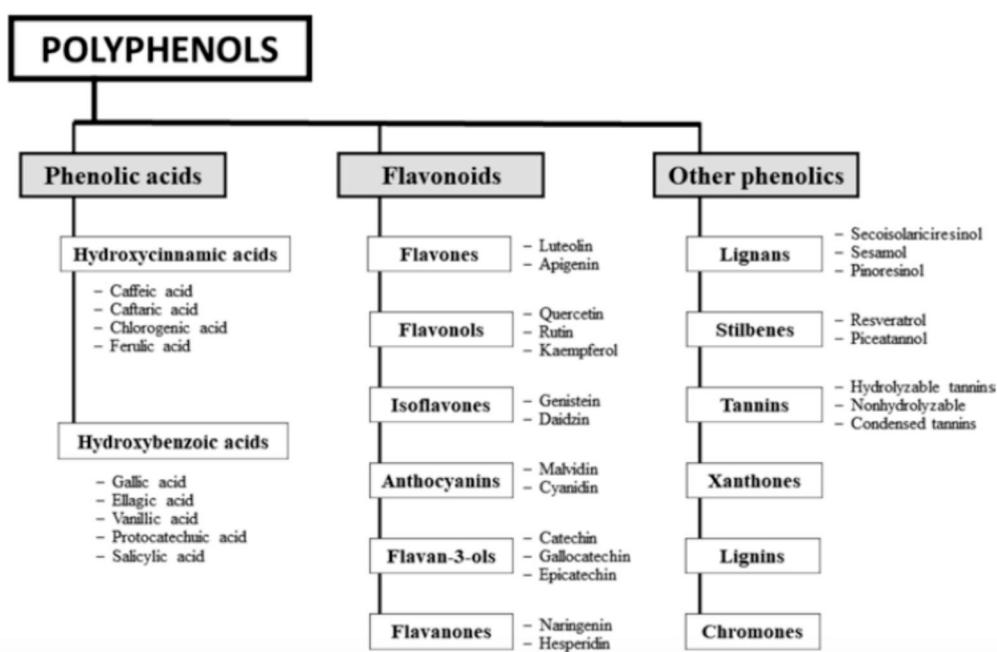
2.2.2. Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são uma enorme classe de antioxidantes amplamente encontrados em matrizes vegetais, sendo que alguns deles podem ser específicos a um determinado órgão ou estágio de desenvolvimento das plantas (CHEYNIER, 2012; NACZK *et al.*, 2004; PETERSON *et al.*, 1998). A FIGURA 3 apresenta a classificação dos polifenóis ou *polyphenols*, como ácidos fenólicos ou *phenolic acids*, flavonoides ou *flavonoids* e outros fenólicos.

Nas matrizes alimentares, os polifenóis são responsáveis por conferir diversas propriedades benéficas vinculadas a alterações desejáveis como adstringência, cor, aroma e atividade antioxidante (PIMENTEL *et al.*, 2005;

SHAHIDI *et al.*, 2003). Visto que têm também propriedades antiinflamatórias, antimicrobianas, cardioprotetoras, antidiabéticas, antitumorais e anticâncer, os estudos focados na caracterização, quantificação e ação dos polifenóis se tornam cada vez mais relevantes para a indústria dos alimentos (BALASUNDRAM *et al.*, 2006; CARINA BILUCA *et al.*, 2019; REBOREDO-RODRÍGUEZ *et al.*, 2018; YAKHLEF *et al.*, 2018; ZHENG *et al.*, 2017; SHAHIDI *et al.*, 2003). Conforme mencionado no item 2.2.1., o mecanismo de atuação antioxidante pode ocorrer por meio do sequestro de radicais e como quelantes de metais nas etapas de iniciação e propagação do estresse oxidativo.

FIGURA 3 - CLASSIFICAÇÃO DOS POLIFENÓIS EM ÁCIDOS FENÓLICOS (SUBCLASSIFICADOS EM ÁCIDOS HIDROXICINÂMICOS – CAFEICO, CAFTÁRIO, CLOROGÊNICO E FERÚLICO, E EM ÁCIDOS HIDROXIBENZÓICOS – GÁLICO, ELÁGICO, VANÍLICO, PROTOCATECUICO, SALICÍLICO), FLAVONOIDES (SUBCLASSIFICADOS EM FLAVONAS – LUTEOLINA, APIGENINA, EM FLAVONÓIS – QUERCETINA, RUTINA E KAEMPFEROL, EM ISOFLAVONAS – GENISTEIN E DAIDZINA, EM ANTOCIANINAS – MALVIDINA E CIANIDINA, EM FLAVAN-3-OLS – CATEQUINA, GALOCATEQUINA E EPICATEQUINA, E EM FLAVANONAS – NARINGENINA E HESPERDINA) E OUTROS FENÓLICOS (LIGNANAS, ESTILBENOS, TANINOS, XANTÔNICOS, LIGNINAS E CUMARINAS)



FONTE: CARPENA *et al.*, 2021

A biodisponibilidade dos polifenóis varia conforme sua estrutura química. Flavonas, isoflavonas, flavonóis e antocianidinas são frequentemente glicosiladas (ZHANG *et al.*, 2006). Os benefícios de se consumir polifenóis está

vinculado, principalmente, à ação prebiótica com modulação da microbiota intestinal, visto que as bactérias benéficas se alimentam destas substâncias, tornando o ambiente mais propício ao desenvolvimento delas (KLINDER *et al.*, 2016). O ácido clorogênico, por exemplo, apenas pode ser metabolizado via microbiota intestinal e não por quaisquer outras enzimas presentes nos tecidos humanos (ABBAS *et al.*, 2016).

2.3 MÉTODOS DE EXTRAÇÃO DE BIOATIVOS EM MATRIZES VEGETAIS

A extração sólido-líquido (ESL) pode ser considerada como uma operação unitária amplamente utilizada na indústria de alimentos (PINELO *et al.*, 2006). É um processo de transferência de massa no qual os compostos de interesse são extraídos por meio do contato com solvente. O objetivo da ESL é empregar pequenas quantidades de solvente a fim de se obter um extrato altamente concentrado (BERK, 2009). As formas convencionais de ESL englobam técnicas de arraste, prensagem, maceração e Soxhlet, sendo que a eficiência do método depende de fatores como (ZHANG *et al.*, 2018):

- Interação molecular do solvente com os compostos de interesse;
- Tempo de extração;
- Temperatura de extração;
- Proporção sólido-líquido;
- pH de operação;
- Tamanho das partículas sólidas;
- Presença de substâncias interferentes.

A TABELA 4 apresenta a descrição das técnicas de extração convencionais, bem como suas vantagens e desvantagens.

TABELA 4 - TÉCNICAS DE EXTRAÇÃO CONVENCIONAIS E SUAS RESPECTIVAS VANTAGENS E DESVANTAGENS

TÉCNICA	DESCRIÇÃO	VANTAGENS	DESVANTAGENS	REFERÊNCIA
MACERAÇÃO	AMOSTRA É COLOCADA EM CONTATO COM O SOLVENTE E MACERADA	TÉCNICA SIMPLES E DE BAIXO CUSTO	BAIXA EFICIÊNCIA DE EXTRAÇÃO, LONGOS PERÍODOS DE EXTRAÇÃO E GRANDES QUANTIDADES DE SOLVENTE	ZHANG <i>et al</i> , 2018
SOXHLET	EXTRAÇÃO A QUENTE, BASEADA NO PRINCÍPIO DE REFLUXO CONTÍNUO	TÉCNICA SIMPLES E DE BAIXO CUSTO, NÃO É NECESSÁRIO FILTRAR	LONGOS PERÍODOS DE EXTRAÇÃO, GRANDES QUANTIDADES DE SOLVENTE, ALTAS TEMPERATURAS	ZHANG <i>et al</i> , 2018; CAMEL, 2001
ESL COM CALOR E AGITAÇÃO	APLICAÇÃO DE CALOR DE FORMA INDIRETA E AGITAÇÃO CONSTANTE	TÉCNICA SIMPLES E DE BAIXO CUSTO, PEQUENAS QUANTIDADES DE SOLVENTE, CURTOS PERÍODOS DE EXTRAÇÃO	RENDIMENTO INFERIOR	ZHANG <i>et al</i> , 2018

FONTE: Adaptado de UEDA, 2020.

2.3.1. Solventes empregados na extração de biocompostos

A eficiência do processo de extração está diretamente relacionada à escolha do solvente adequado. Os parâmetros como tempo e temperaturas de extração, proporção entre solvente e amostra, tipo de matriz vegetal, tamanho das partículas e as características dos bioativos presentes, devem ser analisados durante a escolha do solvente. Solventes convencionais como água, etanol, metanol, acetona e hexano são amplamente utilizados para a extração de biocompostos (GARCÍA *et al*, 2016; MARSH *et al*, 2002).

O uso de solventes orgânicos apresenta alta aplicabilidade, eficiência e facilidade de uso, porém, há pontos negativos decorrentes da alta toxicidade da maioria deles (SAFDAR *et al*, 2017). A água é um dos solventes mais utilizados durante a extração de compostos bioativos e apresenta ótima acessibilidade, baixo custo, boa seletividade e influência das ligações de hidrogênio durante o processo de transferência de massa, entretanto, a água torna a extração restrita a determinadas faixas de temperatura e sua capacidade calorífica pode gerar alto consumo de energia (DOBLE *et al*, 2007).

Assim, é interessante associar o etanol, solvente orgânico com baixos riscos à saúde e ao meio ambiente, à água em misturas, uma vez que em conjunto têm maior capacidade de extração e menor *carbon footprint* ou pegada de carbono (ARISTIZÁBAL *et al.*, 2019).

2.4 REAÇÃO DE MAILLARD

O bioquímico francês, Louis Camille Maillard (1878–1936), foi o primeiro a descrever o fenômeno de escurecimento não enzimático dos alimentos durante o processamento como uma reação entre açúcares redutores e aminoácidos (MAILLARD, 1912).

Foi proposto por Hodge, no ano de 1953, que a reação se dá em três fases: inicial, intermediária e final. Cada fase se caracteriza pela formação de produtos específicos, ou marcadores, que denotam a intensidade do tratamento térmico e as perdas do valor nutricional por conta da degradação do aminoácido lisina (HODGE, 1953).

A denominada reação de Maillard, esquematizada na FIGURA 4, é hoje aceita como a série de reações paralelas e subsequentes que originam inúmeros compostos a partir da interação entre o grupamento amino proveniente de aminoácidos, peptídeos, aminofosfolipídeos ou proteínas, e o grupamento carbonílico presente em açúcares redutores ou produtos de oxidação do ácido ascórbico, lipídeos ou aminoácidos (HIDALGO *et. al.*, 2005; FAN *et. al.*, 2006).

A interação inicial entre os grupamentos amino e carbonílico é uma condensação reversível que gera uma carbinolamina intermediária, a qual desidrata e forma um aduto de imina instável, sem cor, sem sabor e sem aroma denominada base de Schiff (TREVISAN, 2015). Conforme o ilustrado pela Figura 1, esta base se rearranja em uma glicosilamina N-substituída cuja estrutura cíclica é mais estável (BHARATE, 2012). Nesta reação, as aminas terciárias são inativas e as primárias são mais reativas do que as secundárias (BARBOSA *et. al.*, 2016). Vale citar que em pH fisiológico e temperatura ambiente, a base de Schiff gera 1-amino-2-desoxi-2-cetose N-substituída, a qual posteriormente dá origem aos denominados compostos de Amadori (BHARATE, 2012).

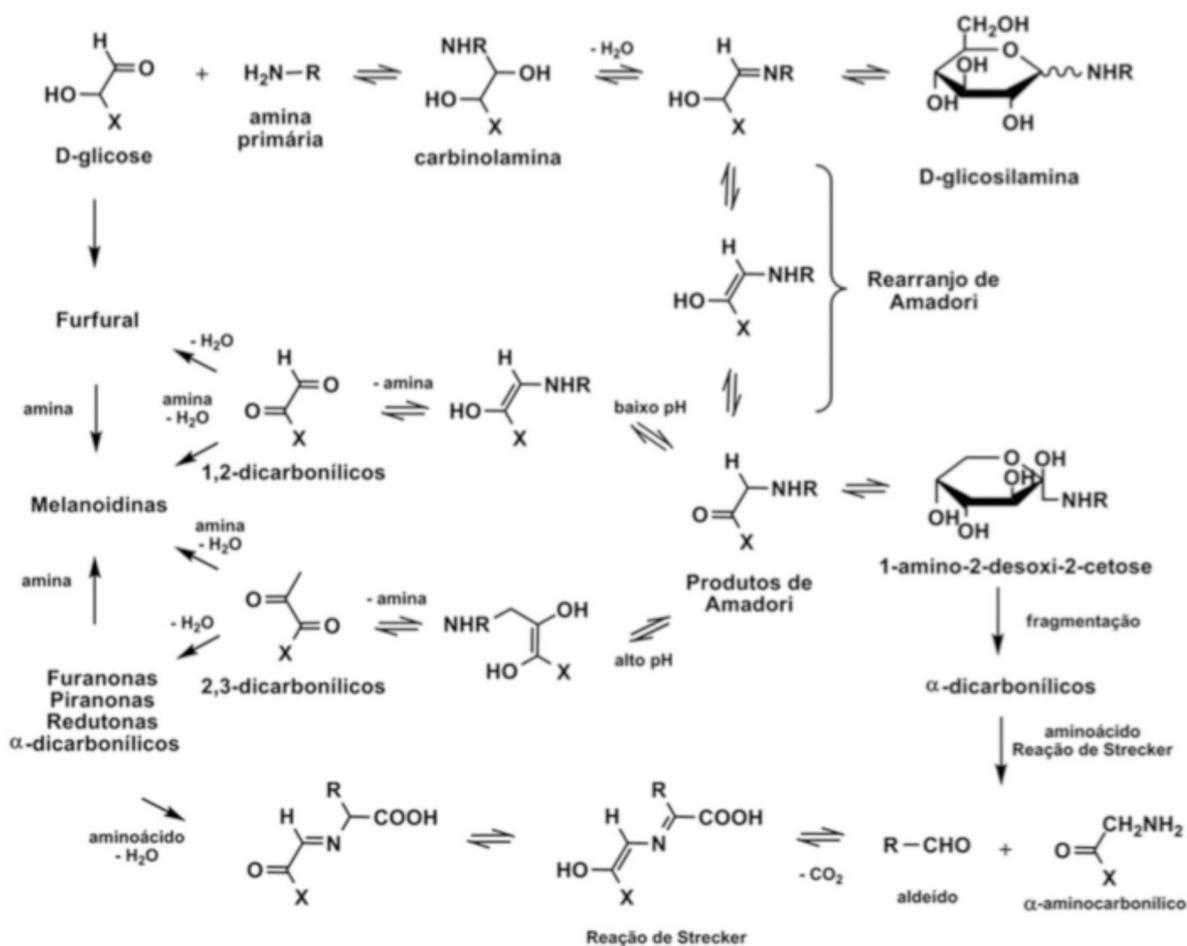
Estes compostos podem reagir de acordo com a dependência do pH em duas vias principais. Em valores baixos de pH ocorre enolização gerando 1,2-dicarbonílicos, os quais desidratam e formam derivados de furfural, enquanto em valores altos de pH, há enolização com formação de 2,3-dicarbonílicos, os quais desidratam e originam redutonas (BARBOSA *et. al.*, 2016). Durante a ciclização dos intermediários 2,3-dicarbonílicos são geradas furanonas e piranonas, as quais são empregadas como flavorizantes alimentícios (POULSEN *et. al.*, 2013).

É importante comentar que as cetoses não redutoras também se condensam a grupamentos amino e geram 1-amino-2-desoxi-aldoses correspondentes, via essa denominada de rearranjo de Heyns (VISTOLI *et. al.*, 2013; POULSEN *et. al.*, 2013). Já na via de Namiki, ocorre a fragmentação dos açúcares por intermédio de radicais livres e os produtos de Amadori formam compostos α -dicarbonílicos, como glioxal e metilglioxal, os quais reagem com aminoácidos via degradação de Strecker e geram derivados de pirazinas, substâncias aromáticas típicas de alimentos submetidos ao processamento térmico (BARBOSA *et. al.*, 2016; PENG *et. al.*, 2011).

Os AGEs podem tanto ser adutos proteicos, como carboximetilisina, ou CML, carboxietilisina, ou CEL, e pirralina, quanto produtos de ligações cruzadas

entre diferentes resíduos de aminoácidos, como a glicosepana, pentosidina, o dímero de lisina-glioxal, ou GOLD, e o produto da condensação cruzada entre lisina, arginina e 3-desoxiglicose, denominado DODIC (POULSEN *et. al.*, 2013).

FIGURA 4 - REAÇÃO DE MAILLARD ESQUEMATIZADA



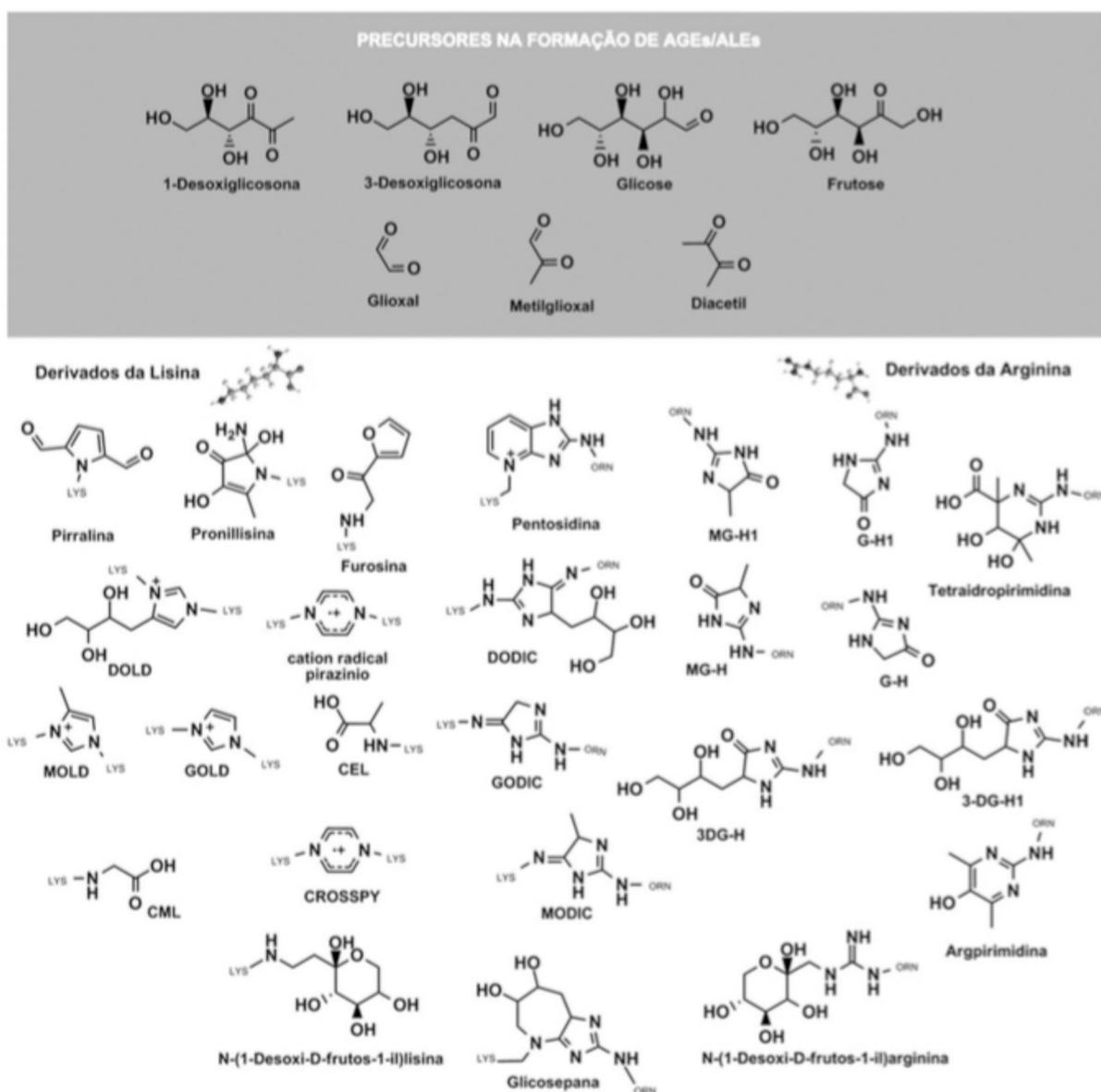
FONTE: BARBOSA *et. al.*, 2016.

Os compostos α -dicarbonílicos são altamente reativos e considerados os principais precursores da formação de produtos finais de glicação avançada, AGEs, e de lipoxidação avançada, ALEs (VISTOLI *et. al.*, 2013; POULSEN *et. al.*, 2013). A FIGURA 5 apresenta a estrutura dos compostos α -dicarbonílicos e dos AGEs derivados dos aminoácidos lisina e arginina.

É possível ainda que produtos carbonílicos gerados durante a reação de Maillard se condensem a resíduos de aminoácidos, originando compostos poliméricos, heterocíclicos, insaturados, de elevado peso molecular e coloração característica, denominados melanoidinas (URIBARRI, 2017). As melanoidinas

são responsáveis pela típica aparência dos alimentos processados que é desejada pelos consumidores e, ao contrário de outros produtos de glicação, têm propriedades antioxidantes, antimicrobianas, antiinflamatórias e prébióticas, sendo consideradas benéficas ao organismo (MESÍAS *et. al.*, 2017).

FIGURA 5 - PRECURSORES DA FORMAÇÃO DE AGES/ALES E ESTRUTURA DOS AGES DERIVADOS DOS AMINOÁCIDOS LISINA E ARGININA



FONTE: BARBOSA *et. al.*, 2016.

Vale citar que a reatividade dos açúcares está diretamente vinculada à abundância de suas estruturas em cadeia aberta, as quais variam de 0,0002% para a glicose e 0,7% para a frutose, justificando a menor reatividade da glicose

mesmo contendo o grupo funcional aldose, que é mais eletrofílico frente à cetose (VISTOLI *et. al.*, 2013; LAROQUE *et. al.*, 2008). Inclusive, os metabólitos da frutose, como frutose-6-fosfato e gliceraldeído-3-fosfato, chegam a apresentar reatividade, em condições fisiológicas, 200 vezes superior à glicose, denotando que o uso corriqueiro de xarope de frutose como adoçante em alimentos e bebidas industrializados é um risco para a saúde (BARBOSA, *et. al.*, 2016).

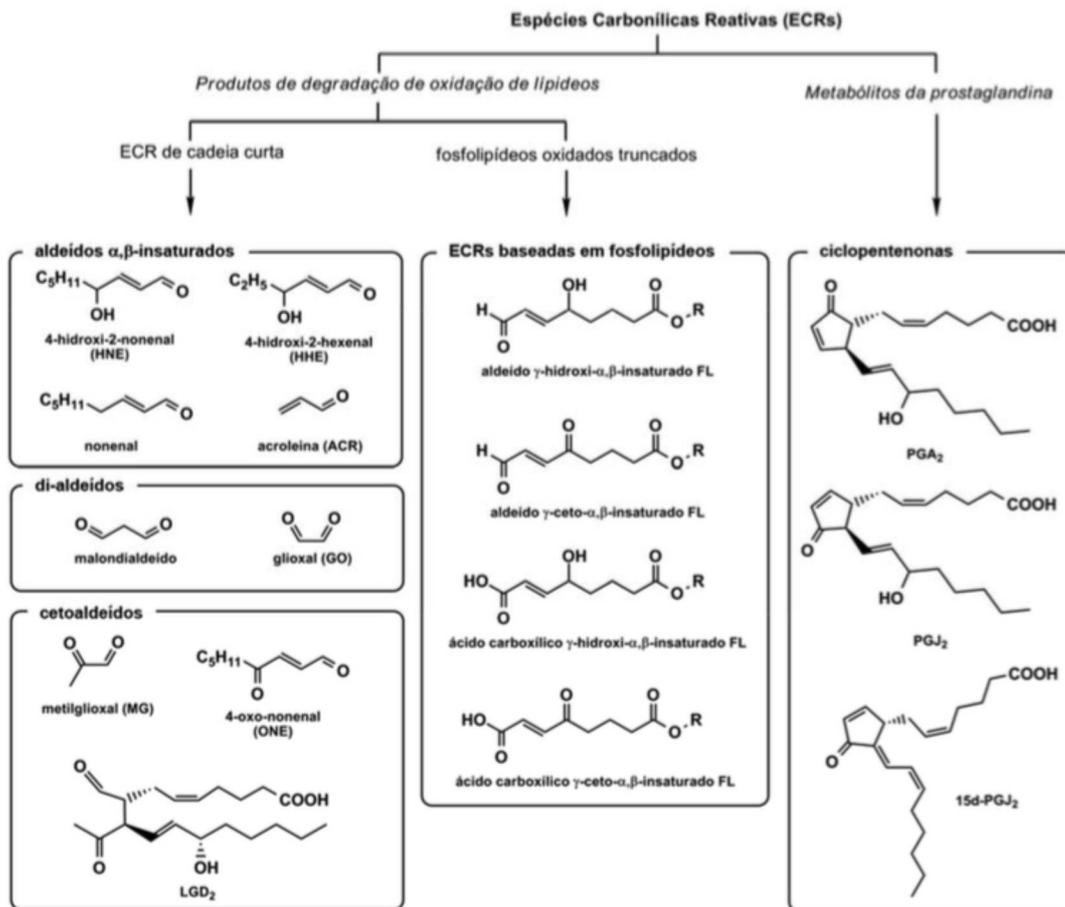
Embora ainda não se tenha elucidado completamente a formação complexa dos AGEs, duas de suas principais rotas são consideradas bem estabelecidas. A primeira delas diz respeito aos rearranjos irreversíveis dos produtos de Amadori submetidos, ou não, à oxidação. A segunda trata da condensação entre produtos carbonílicos gerados desde as fases iniciais da reação de Maillard e cadeias laterais dos resíduos de arginina, lisina e cisteína. Visto que há grande variedade de fatores e substratos, muitos AGEs diferentes podem ser gerados. As reações oxidativas não estão obrigatoriamente envolvidas na formação dos AGEs, adequando melhor o termo *glicação* em comparação a *glicoxidação* (HELLWIG *et. al.*, 2014; MONNIER, 2003).

Já os denominados ALEs, são compostos gerados pela reação entre espécies carbonílicas reativas, cuja produção se dá via peroxidação lipídica ou por metabolismo dos lipídeos, e centros nucleofílicos de macromoléculas, como proteínas, ácidos nucleicos e aminofosfolipídeos, causando alterações irreversíveis em suas conformações originais (VISTOLI *et. al.*, 2013; DOMINGUES *et. al.*, 2013). Conforme também ilustrado na FIGURA 6, as espécies carbonílicas reativas formadas durante a peroxidação lipídica podem ser divididas em três categorias. A primeira trata de aldeídos α,β -insaturados, como 4-hidroxi-2-nonenal (HNE), 4-hidroxi-hexenal (HHE), nonenal e acroleína. A segunda categoria engloba os di-aldeídos, como malondialdeído e o glioxal, enquanto a terceira contém os cetoaldeídos, a exemplo do metigloixal, 4-oxo-nonenal e os isoacetais ou isolevuglandinas (VISTOLI *et. al.*, 2013; DOMINGUES *et. al.*, 2013).

As espécies carbonílicas reativas podem ainda formar bases de Schiff. Ocorre quando polos eletrofílicos de fosfolipídeos oxidados reagem com polos nucleofílicos de proteínas, sendo que a catepsina B e a angiotensina II atuam como alvos *in vivo* de fosfolipídios oxidados (PAMPLONA, 2011; HOFF *et. al.*,

2003; SILVA *et al.*, 2011). Mais especificações sobre as reações *in vivo* serão abordadas na sequência.

FIGURA 6 - ESPÉCIES CARBONÍLICAS REATIVAS DA PEROXIDAÇÃO LIPÍDICA E DO METABOLISMO DOS LIPÍDEOS



FONTE: BARBOSA *et al.*, 2016.

2.4.1. Produtos finais de glicação avançada *in vivo*

As reações de formação de AGEs e ALEs *in vivo* acontecem em todos os tecidos e fluidos corporais, afetando, principalmente, moléculas de meia-vida longa e o processo natural de envelhecimento (HELLWIG *et al.*, 2014). De acordo com Thessier, 2010, alguns dos fatores mais importantes vinculados à glicação em sistemas biológicos ou ao acúmulo de AGEs e ALEs nos tecidos são:

- Natureza dos substratos carbonílicos precursores (glicação);
- Concentração dos substratos carbonílicos precursores (acúmulo);

- Disponibilidade dos grupos amino das biomoléculas (glicação);
- Reatividade dos grupos amino das biomoléculas (glicação);
- Taxa de renovação, ou *turnover*, das proteínas (acúmulo);
- Degradação química ou enzimática dos compostos formados (glicação);
- Taxa de excreção renal dos produtos de degradação (glicação).

A reação de glicação de uma proteína acontece até o estado de equilíbrio, o qual depende da taxa de formação dos produtos de Amadori e sua respectiva reversão ou conversão a outros produtos. A reversão enzimática envolve fosforilação do produto de Amadori conjunta à liberação de 3-desoxiglicosona, ou 3-DG, enquanto a reversão não enzimática gera glicose e manose (DELPPIERRE *et. al.*, 2000; COLLARD *et. al.*, 2003). Vale citar ainda que as reações de conversão têm maior complexidade e geram diversos compostos carbonílicos e dicarbonílicos, livres ou ligados a proteínas, originando, então, os AGEs. Estas reações são análogas àquelas que ocorrem nos alimentos durante o processamento térmico ou armazenamento (ZHANG *et. al.*, 2009).

Há outros mecanismos já identificados em condições fisiológicas que contribuem para a formação de AGEs e ALEs, como a fragmentação da base de Schiff, a degradação da frutosamina, a formação de compostos α,β -dicarbonílicos gerados a partir da degradação de intermediários glicolíticos e da peroxidação lipídica (MONNIER, 2003; BARBOSA *et. al.*, 2016). É importante comentar que tanto a formação de produtos finais de glicação avançada, quanto de lipoxidação avançada, podem ser favorecidas sob estresse oxidativo, ainda que em ausência do estado hiperglicêmico (URIBARRI *et. al.*, 2015).

Há AGEs e ALEs encontrados em alimentos que também são identificados *in vivo*, como carboximetilisina, carboxietilisina, pirralina, MOLD, GOLD, o dímero de 3-desoxiglicosona-lisina, pentosidina, argipirimidina e hidroimidazonas, as quais são derivadas do metilglioxal, glioxal e 3-DG (MONNIER, 2003). A seguir se apresentam as proporções de glicação em sistemas biológicos por diferentes espécies (POULSEN *et. al.*, 2013):

- 0,01 a 1% para resíduos de lisina e arginina em proteínas;
- 1 a 5% para adutos de base de Schiff em albumina sérica humana;
- 6 a 15% para frutosamina em albumina sérica humana;

- 0,01 a 7% para AGEs em albumina sérica humana;
- 0,1 a 16% em fosfolípidos, estando este percentual relacionado tanto à glicação quanto à oxidação.

Outro ponto importante da glicação em seres vivos são os intermediários metabólicos altamente reativos, como o gliceraldeído-3-fosfato e a dihidroxiacetona fosfato, os quais são considerados os mais importantes precursores da formação endógena de AGEs (BROWNLEE, 2001; BRWONLEE, 2005). Muitos produtos finais de glicação avançada, como a carboximetilisina e a pentosidina, podem se acumular nos tecidos de renovação lenta, como é o caso do cristalino e do tecido conjuntivo, trazendo maiores complicações ao longo dos anos (DUNN *et. al.*, 1991; BARBOSA *et. al.*, 2016). Vale citar que em indivíduos adultos normoglicêmicos, por volta de 2% das proteínas sofreram modificações estruturais e funcionais por AGEs ou ALEs, enquanto em indivíduos diabéticos estas modificações são de até 6% (HELLWIG *et. al.*, 2014).

Uma curiosidade é que alguns dos efeitos observados no diabetes têm semelhança com consequências fisiológicas do envelhecimento, como o escurecimento do cristalino, também denominado catarata, apontando a teoria da glicação como diretamente responsável pelo envelhecimento dos seres humanos (CERAMI, 1985; BARBOSA *et. al.*, 2016). Na pele, os AGEs e ALEs modificam a conformação do colágeno e da elastina, prejudicando a elasticidade e a taxa de renovação, ou *turnover*, das células. A interação destes compostos com receptores celulares RAGE induz o estresse oxidativo e aciona a inflamação em efeito dominó, culminando na patogênese de patologias vinculadas aos AGEs e ALEs (CHONG *et. al.*, 2007; LITWINOFF *et. al.*, 2015). A seguir algumas das disfunções fisiológicas relacionadas à interação dos AGEs com seus respectivos receptores RAGE:

- Diabetes dos tipos 1 e 2 (LITWINOFF *et. al.*, 2015);
- Obesidade (BOYER *et. al.*, 2015);
- Asma (OCZYPOK *et. al.*, 2015);
- Aterosclerose (YAMAGISHI, 2011);
- Artrite reumatoide (SHAW *et. al.*, 2003);
- Sarcopenia (SEMBA *et. al.*, 2010);
- Osteoporose (HEIN, 2006);

- Mal de Alzheimer (LI *et. al.*, 2012; SRIKANTH *et. al.*, 2011);
- Doença pulmonar obstrutiva crônica (KIRKHAM *et. al.*, 2013);
- Insuficiência renal crônica (FUKAMI *et. al.*, 2015);
- Câncer (RIEHL *et. al.*, 2009; GEBHARDT *et. al.*, 2008).

Além dos receptores RAGE, há outros, como AGE-R1, AGE-R2, AGE-R3 e os receptores sequestradores, ou receptores *scavenger*, de macrófagos, que também têm a capacidade de se ligar aos AGEs, embora não tenham demonstrado atividades de transdução de sinal após a interação. Estes receptores estão vinculados à detoxificação destes compostos (GOLDIN *et. al.*, 2006; BARBOSA *et. al.*, 2008). O AGE-R1 é considerado fundamental para a homeostase orgânica e é conhecido que supressões em seus níveis de expressão, como acontece em estados diabéticos, denota o prejuízo do sistema imunológico dos indivíduos (VLASSARA *et. al.*, 2001).

Os níveis de AGEs e espécies reativas do oxigênio, sendo estes radicais livres ou não, regulam a manifestação dos receptores celulares, RAGE e AGE-R1, e também suas vias associadas. Portanto, intensa elevação dos níveis de AGEs gera aumento nas expressões de RAGE e AGE-R1. Em quadros diabéticos e nefropáticos crônicos, a expressão de RAGE se mantém elevada, enquanto os níveis de AGE-R1 são suprimidos, independente de intervenção terapêutica para o controle glicêmico (VLASSARA *et. al.*, 2014; BARBOSA *et. al.*, 2016). É importante mencionar ainda os exemplos a seguir de condições metabólicas que aumentam as concentrações plasmáticas de AGEs e ALEs (THORNALLEY *et. al.*, 2014):

- Hiperglicemia, por conta da alta disponibilidade de glicose e seus metabólitos;
- Insuficiência renal, que compromete a excreção dos adutos de glicação ou lipoxidação plasmáticos;
- Cirrose hepática, que prejudica o catabolismo fisiológico da albumina, aumentando sua meia-vida no plasma e sua susceptibilidade às reações de glicação e lipoxidação.

A remoção dos AGEs gerados nos tecidos é via proteólise extracelular ou por intermédio de células sequestradoras, denominadas *scavengers*, como os macrófagos. Estas células endocitam AGEs e ALEs através de receptores e,

após a degradação intracelular, liberam no sistema circulatório os fragmentos solúveis e de baixo peso molecular, ou AGE-peptídeos, para serem excretados com a urina. Alguns dos AGEs-peptídeos podem ser intermediários reativos, porém seus efeitos são limitados pela excreção renal, denotando que a eficiência de remoção dos AGEs é dependente do denominado *clearance* renal (BARBOSA *et al.*, 2009; THORNALLEY *et al.*, 2014).

Em resumo, a ação e os efeitos patológicos dos AGEs *in vivo* acontecem por quatro vias principais:

- **Alteração da atividade das enzimas:** a albumina sérica glicada por metilglioxal demonstrou prejuízo no desempenho frente à albumina sérica não glicada (AHMED *et al.*, 2005);
- **Formação de ligações cruzadas, ou *cross-linking*, com proteínas, causando enrijecimento tecidual:** as principais proteínas afetadas são aquelas de meia-vida longa, como o colágeno e as proteínas constituintes do cristalino (BADENHORST *et al.*, 2003);
- **Interação de AGEs com seus receptores celulares ativa sinais de transdução e induz respostas inflamatórias:** a ativação do fator nuclear NF- κ B aumenta a transcrição para citocinas pró-inflamatórias, promovendo o estresse oxidativo, trombogênese e angiogênese, o que está relacionado a complicações vasculares do diabetes (HUTTUNEN *et al.*, 1999; HUANG *et al.*, 2001; WAUTIER *et al.*, 2001; HARJA *et al.*, 2008; SEMBA *et al.*, 2010);
- **Aumenta o estresse oxidativo:** a interação dos AGEs com seus receptores ativa o cofator NADPH oxidase, induzindo a formação de espécies reativas do oxigênio (NEGRE-SALVAYRE *et al.*, 2009). O estresse oxidativo contribui para reduzir a biodisponibilidade do óxido nítrico e aumentar a formação de nitrato, o que prejudica a função endotelial (BASTA *et al.*, 2004). Em pacientes diabéticos, elevados níveis de LDL modificado por AGEs se vinculam ao estresse oxidativo com formação de células espumosas e placas de ateroma (TAMES *et al.*, 1992).

Vale comentar que além da cadeia de formação, absorção e eliminação dos AGEs, há fatores genéticos que também podem influenciar seu metabolismo para cada indivíduo (LESLIE *et al.*, 2003; VLASSARA *et al.*, 2014).

2.4.2. Produtos finais de glicação avançada em alimentos

A taxa de formação e a diversidade dos AGEs nos alimentos dependem, principalmente, dos seguintes fatores (POULSEN *et al.*, 2013; MORRISSEY *et al.*, 1989):

- Temperatura de processamento;
- Tempo de processamento;
- Composição dos reagentes;
- Concentração dos reagentes;
- Atividade de água;
- Presença de íons metálicos;
- pH.

A conversão dos produtos via reação de Maillard é diretamente proporcional à temperatura, ao tempo de processamento, à concentração dos reagentes e ao pH, visto que quanto mais alcalino é o meio, maior é a taxa de formação dos produtos até se atingir o platô no pH igual a 10. É conhecido que a velocidade da reação de Maillard duplica conforme há aumento de 10°C. A atividade de água ótima está entre 0,4 e 0,7, pois há boa mobilidade dos reagentes sem ocorrer diluição. Os íons metálicos podem atuar como catalisadores da reação (POULSEN *et al.*, 2013; MORRISSEY *et al.*, 1989; BARBOSA *et al.*, 2016; TREVISAN, 2015).

A exemplo do tempo e temperatura de processamento, quando avaliado o escurecimento do alimento como medidor da taxa de reação de Maillard, os mesmos resultados foram obtidos nas seguintes condições (LEDL *et al.*, 1990):

- 4 semanas a 20°C;
- 3 horas a 100°C;
- 5 minutos a 150°C.

Levando-se em conta um consumo médio de alimentos termicamente processados, como lácteos e café, foi estimado um consumo diário de 1500 a

4000 μmol de produtos de Amadori, calculado como frutossilina, e de 100 a 300 μmol de AGEs, como pirralina e carboximetilisina (HENLE, 2005).

Pesquisadores da Escola de Medicina Mount Sinai, nos Estados Unidos, investigaram o conteúdo em metilglioxal e carboximetilisina em 549 alimentos e produtos alimentícios de consumo corriqueiro na dieta norte-americana (GOLDBERG *et al.*, 2004; URIBARRI *et al.*, 2010). Estes estudos verificaram que os teores de carboximetilisina presentes se relacionavam com os níveis correspondentes de metilglioxal, e que, elevados teores de AGEs existiam em alimentos ricos em proteínas e gorduras, como carnes processadas. Foi verificado também que dentre os grupos dos cereais processados, como pães, bolos e biscoitos, apresentavam, surpreendentemente, menor quantidade de AGEs frente aos alimentos ricos em proteínas e gorduras, como lácteos e cárneos, sugerindo importante influência da oxidação lipídica sobre o teor final de AGEs encontrado (BARBOSA *et al.*, 2016).

Em contrapartida, em outro estudo (ASSAR *et al.*, 2009) no qual foi quantificado o teor de carboximetilisina em diversas matrizes alimentares, como pães, carnes, lácteos e óleos, foi verificado maior conteúdo nos alimentos ricos em carboidratos. Os resultados das medições dos inúmeros estudos diferem entre si e dão margem para debates a respeito, estando alguns dos resultados da literatura compilados na FIGURA 7 (BARBOSA *et al.*, 2016).

Os métodos de avaliação citados na FIGURA 4 são: cromatografia líquida de alta eficiência acoplada a detector espectrofotométrico na região do ultravioleta (CLAE-UV), teste imunoenzimático competitivo (ELISA), cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas tandem (LC-MS/MS), cromatografia líquida de ultraperformance acoplada à espectrometria de massas tandem (UPLC-MS/MS) e espectrometria de massas (MS).

Um estudo que fez uso do método ELISA para investigar a absorção de AGEs presentes em alimentos, estimou que cerca de 10% dos AGEs ingeridos com a dieta são absorvidos e que, desta fração, 66% permanecem no organismo e apenas 33% é excretado por indivíduos com função renal não comprometida (KOSCHINSKY *et al.*, 1997).

FIGURA 7 - TEOR DE AGES E ALES EM ALIMENTOS POR MÉTODOS DISTINTOS

Alimentos	Conteúdo em AGES/ALEs	Marcador	Método
Café	47 U/mL	CML	ELISA
Café	10,8 – 39,9 ng/kg Ptn	Pentosidina	CLAE
Café	0 – 618 mg/kg Ptn	CML	CLAE
Fórmula láctea infantil	5-25 mg/kg Ptn	CML	GC-MS
Fórmula láctea infantil	54 – 72 ng/kg Ptn	CML	LC-MS/MS
Fórmula hipoalergênica	135 – 322 ng/kg Ptn	CML	LC-MS/MS
Fórmula láctea infantil	4.861 U/g alimento	CML	ELISA
Leite integral	48 U/g alimento	CML	ELISA
Leite pasteurizado	198 ± 247 ng/mL	CML	LC-MS/MS
Leite condensado	16.418 ± 1338 ng/mL	CML	LC-MS/MS
Leite UHT	638 ± 468 ng/mL	CML	LC-MS/MS
Leite pasteurizado	2,08 ± 0,49 ng/mL	CML	LC-MS/MS
Leite condensado	205 ± 7 ng/mg Ptn	CML	LC-MS/MS
Leite integral cru	188 ± 93 ng/mL	CML	LC-MS/MS
Bebida achocolatada	1135 ± 44,9 mg kg Ptn	CML	LC-MS/MS
Bebida achocolatada	0,38 mg/100 g	CML	UPLC-MS/MS
Leite pasteurizado	16,2 ng/mg Ptn	CML	LC-MS/MS
Bebida láctea fermentada	140 U/garrafa	CML	ELISA
Manteiga	37,01 ng/kg Ptn	CML	LC-MS/MS
Manteiga	264,873 U/g	CML	ELISA
Frango cozido	11.236 U/g	CML	ELISA
Frango assado	60.203 U/g	CML	ELISA
Frango cozido	0,18 ± 0,03 mg/100 g	CML	UPLC-MS/MS
Frango cozido	192 ± 24 µg/100 g	Pentosidina	CLAE
Frango assado	254 ± 23 µg/100 g	Pentosidina	CLAE
Frango cozido	638 ± 45 µg/100 g	CML	CLAE
Molho de soja	10-82 µg/100 mL	Pentosidina	CLAE
Molho de tomate	20 – 76 µg/100 mL	Pentosidina	CLAE
Aveia	103 408 ng/kg/Ptn	CML	LC-MS/MS
Aveia	232 – 285 ng/kg/Ptn	CML	GC-MS
Aveia	42 – 170 mg/kg/Ptn	CML	ELISA
Pão, crosta	366 U/g	CML	ELISA
Pão, crosta	388 mg/kg Ptn	CML	LC-MS/MS
Pão, miolo	31,4 ng/kg Ptn	CML	LC-MS/MS
Pão, miolo	225 U/g	CML	ELISA
Pão branco	0,24 ± 0,02 ng CML/100 g	CML	UPLC-MS/MS

FONTE: Adaptado de BARBOSA *et. al.*, 2016.

Em outro estudo (HE *et al.*, 1999) que empregou carbono marcado (^{14}C) e envolveu camundongos, foi possível registrar que, após 72 horas, 60% dos AGEs absorvidos se encontravam no fígado e nos rins, embora radioatividade tenha sido detectada nos pulmões, coração e baço, indicando distribuição generalizada dos AGEs dietéticos. Tanto a provável afinidade dos produtos finais de glicação avançada a determinadas proteínas orgânicas presentes, principalmente, no fígado e nos rins, quanto a interferência na taxa de renovação celular ainda não foram completamente elucidadas. Estas limitações sobre a

absorção, distribuição, metabolismo e excreção dos AGEs dietéticos no corpo, denota que ainda há necessidade de se desenvolver estudos com protocolo experimental adequado para o esclarecimento de tais questões em aberto (BARBOSA *et al.*, 2016).

2.4.3. Atividade antiglicante

Há diversas etapas na formação dos AGEs, portanto, as atividades antiglicantes podem acontecer a qualquer momento antes da estabilidade final (YELTSIN, 2017). Em resumo, os mecanismos capazes de atrasar ou reduzir a síntese de produtos finais de glicação avançada são:

- **Redução da formação de radicais livres durante o processo de glicação:** o estágio inicial da reação de Maillard é acompanhado pela produção de uma grande quantidade de radicais livres. Além disso, as bases de Schiff são propensas à oxidação para produzir radicais livres e espécies carbonílicas reativas. Logo, na fase inicial da glicação, capturar radicais livres para minimizar o estresse oxidativo e diminuir a produção de espécies carbonílicas reativas pode inibir a glicação (ZIEMAN *et al.*, 2004; RABBANI *et al.*, 2016).
- **Desintoxicação do metabólito reativo dicarbonílico MG:** a enzima glioxalase I (GLO I) faz parte do sistema glioxalase presente no citosol das células e é responsável por catalisar a isomerização do hemitioacetil, resultando na conversão espontânea do α -oxoaldeído e glutathione em derivados da S-2-hidroxiacilglutathione (ZIEMAN *et al.*, 2004; RABBANI *et al.*, 2016). Foi verificado em camundongos com rins comprometidos em fase aguda que a baixa expressão de glioxalase I, causou aumento significativo da concentração de MG (KUMAGAI *et al.*, 2009). Significa que elevar a expressão desta enzima, auxilia na desintoxicação de MG do organismo.
- **Quelar íons metálicos:** a produção de AGEs está associada à presença de íons de metais de transição, logo, quelar esses íons metálicos também pode inibir a produção de AGEs. Este processo também previne a auto oxidação dos açúcares redutores e produtos de Amadori para minimizar a produção de AGEs (ZIEMAN *et al.*, 2004; RABBANI *et al.*, 2016).

O bloqueio da função do receptor de AGEs (RAGE), a redução do estresse oxidativo e da inflamação também são relevantes. Há polifenóis em produtos naturais que têm atividade antiglicante e interferem na formação de AGEs através de diferentes mecanismos conforme a TABELA 5 (YEH *et al.*, 2016).

De acordo com a TABELA 6, sistemas enzimáticos protetores existem em células de diferentes grupos taxonômicos que previnem a glicação ou reparam proteínas glicadas (AVEMARIA *et al.*, 2012; GOERNER *et al.*, 2013; KAMEYA *et al.*, 2015; RABBANI *et al.*, 2015; SWERGOLD, 2013; VAN SCHAFTINGEN *et al.*, 2012; YAN, 2014).

TABELA 5 - ATUAÇÃO DOS BIOATIVOS DURANTE AS ETAPAS DA GLICAÇÃO

(continua)

MECANISMO	BIOATIVO	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
Inibição de EROs	Ácidos fenólicos	Propriedades antioxidantes	WU et al., 2010
	Lignanas (gergelim)	Inibição de NADPH oxidase mediada por EROs	KONG et al., 2015
	Estilbenos (resveratrol)	Propriedades antioxidantes	LIU et al., 2013; SEO et al., 2014
	Flavonóides		SADOWSKA; BARTOSZ et al., 2014
Inibição da formação de MG	Ácidos fenólicos	Aprisionamento de MG	LO et al., 2011
	Estilbeno (estilbeno glicosídeo)		LV et al., 2010
	Flavonóides (hesperdina)		LI et al., 2012
	Flavonóides (quercetina)		LI et al., 2014
	Flavonóides (EGCG)		WANG et al., 2016
Desintoxicação do MG	Flavonóides (procianidinas)	Ativação da enzima GLO I	CAI et al., 2011
	Estilbenos (resveratrol) + Flavonóides (hesperdinas)		XUE et al., 2016
Inibição da formação prejudicial de AGEs	Ácidos fenólicos	Inibição da formação de AGEs (CML e CEL)	SILVAN et al., 2011; MUTHENA et al., 2012

MECANISMO	BIOATIVO	FUNÇÃO	REFERÊNCIA
Bloqueio dos receptores (RAGE)	Estilbenos (resveratrol)		CIDDI et al., 2014
	Flavonóides (flavonas)	Inibição da formação de AGEs	WU et al., 2005
	Flavonóides (hesperdina)		LI et al., 2012
	Estilbenos (resveratrol)	Melhora de complicações diabéticas	KHAZAEI et al., 2016; MORIDI et al., 2015

FONTE: Adaptado de YEH *et al.*, 2016

TABELA 6 - ENZIMAS ANTIGLICANTES E DEGLICANTES.

(continua)

ENZIMA	NATUREZA DA REAÇÃO DE CATÁLISE
ENZIMAS ANTIGLICANTES	
Glioxalases I e II	Inativação dependente de glutatona de metilglioxal com formação de D-lactoglutationa e D-lactato
Aldeído desidrogenase	Oxidação dependente de NAD(P)H de aldeídos e ácidos carboxílicos correspondentes
Aldose redutase	Redução dependente de NADPH de aldeídos para polióis correspondentes
ENZIMAS DEGLICANTES	

ENZIMAS DEGLICANTES

Amadoriase (frutosamina-3-quinase; proteínas semelhantes)	Fosforilação de produtos de Amadori seguida de sua clivagem de resíduos de aminoácidos e formação de 3-desoxiglucosona e outros dicarbonílicos
Amadoriase II (frutosamina oxidase)*	Oxidação de produtos de Amadori por oxigênio com formação de peróxido de hidrogênio e após clivagem de glicosona a partir de resíduos de aminoácidos
Frutosamina-6-quinase*	Fosforilação de frutosamina em frutosamina-6-fosfato
Deglicase*	Hidrólise da ligação frutosamina-6-fosfato com resíduo de aminoácido e formação de glicose-6-fosfato
Proteínas DJ-1 (PARK7) HSP30	Redução de adutos de lisina, arginina e cisteína com glioxal e MG acompanhado de clivagem de glicolato e D-lactato

FONTE: Adaptado de YELTSIN, 2017.

LEGENDA: * Encontrado apenas em procaríotos.

A primeira linha de defesa compreende enzimas antiglicantes que metabolizam as espécies carbonílicas reativas em polióis ou ácidos (RABBANI *et al.*, 2015; SWERGOLD, 2013; YAN, 2014), sendo o sistema de glicoxalase para inativação do metilglicoxal e outros intermediários dicarbonílicos o mais ativo. A segunda linha de defesa é representada por enzimas de atividade deglicante (VAN SCHAFTINGEN *et al.*, 2012). Foi demonstrado que a expressão de glicoxalase 1, aldose redutase e aldeído desidrogenase foi ativada pelo fator de transcrição NRF-2, que afetou o elemento responsivo antioxidante (ERA) e aumentou o estresse carbonílico como um mecanismo compensatório (RABBANI *et al.*, 2015). A atividade de deglicação foi relatada recentemente para as proteínas da família PTFL/DJ-1 (PARK7)/HSP 30 envolvidas na patogênese da doença de Parkinson (AVEMARIA *et al.*, 2012). O desenvolvimento acelerado de neurodegeneração foi observado em indivíduos portadores de alelos com mutações para enzimas com atividade diminuída (RICHARME *et al.*, 2015).

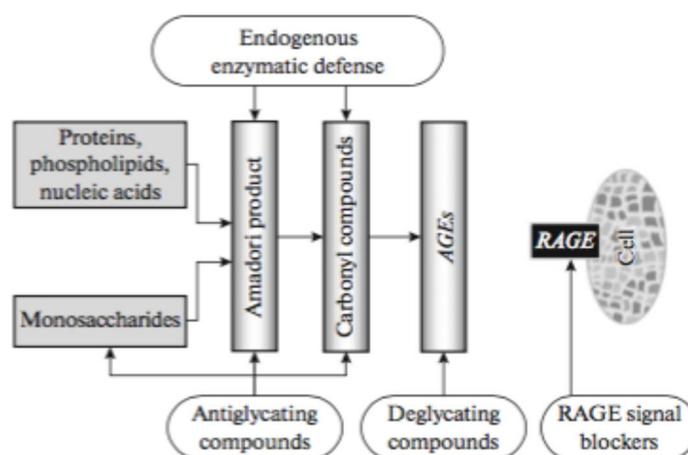
As enzimas de deglicação encontradas apenas em procariotos e fungos são de importância significativa para a construção de biossensores para a detecção de proteínas glicadas no sangue e nos tecidos (KAMEYA *et al.*, 2015). É fundamental notar que as proteínas antiglicantes e deglicantes estão localizadas intracelularmente e não protegem as proteínas da matriz intercelular, como o colágeno (SERGIEV *et al.*, 2015). Além disso, essas enzimas podem afetar apenas os produtos dos estágios inicial e intermediário da glicação. Os produtos finais do processo não podem ser eliminados da composição da proteína, que, neste caso, deve ser submetida à proteólise completa em lisossomos ou proteossomos. Os sistemas proteolíticos compreendem a terceira linha de defesa do proteoma contra a glicação. Este processo ocorre ativamente em micrófagos. Os produtos da proteólise de proteínas glicadas, como oligopeptídeos e aminoácidos individuais que transportam AGEs, circulam no sangue e são removidos do corpo na urina (EMEL'YANOV, 2010; RABBANI *et al.*, 2014; WHITCOM *et al.*, 2015).

Apesar de ter sido comprovado o papel da glicação na patologia humana, os resultados de testes clínicos de intervenção farmacêutica neste processo revelaram resultados ambíguos. Vários alvos para os potenciais compostos protetores podem ser identificados, como apresenta a FIGURA 8. Primeiro, esta é a própria ação antiglicação – competição com alvos moleculares de glicação

para ligação com monossacarídeos, ligação de produtos de Amadori e/ou compostos carbonílicos. Em segundo lugar, pode ser a ligação de radicais livres ou íons metálicos iniciando o desenvolvimento de estresse oxidativo. Terceiro, pode ser a ligação de AGEs e a respectiva clivagem da molécula de proteína, que é a deglicação. Por fim, a proteção contra a glicação pode ser realizada impedindo a interação dos AGEs com o receptor RAGE ou durante os estágios pós-receptor (EMEL'YANOV, 2010; KULKARNI et al., 2013; PENG et al., 2011). Muitas vezes é difícil distinguir estes mecanismos em condições experimentais e, em particular, durante estudos clínicos. É provável que compostos que empregam vários mecanismos exibam o melhor efeito protetor (YELTSIN, 2017).

Os compostos antiglicantes são capazes de formar ligações covalentes tanto com monossacarídeos quanto com produtos de glicação. As substâncias que exibem este tipo de ação possuem grupos contendo nitrogênio (amino-, hidrazina- ou guanidina-) ou grupo tiol em sua composição.

FIGURA 8 - ALVOS DE COMBATE À GLICAÇÃO. PROTEÍNAS, FOSFOLIPÍDIOS E ÁCIDOS NUCLEICOS REAGEM COM MONOSSACARÍDEOS FORMANDO PRODUTOS DE AMADORI, OS QUAIS, POR SUA VEZ, GERAM COMPOSTOS CARBONÍLICOS E, POR FIM, OS AGEs. O SISTEMA DE DEFESA ENDÓGENO-ENZIMÁTICO ATUA NOS PRODUTOS DE AMADORI E COMPOSTOS CARBONÍLICOS. OS COMPOSTOS ANTIGLICANTES ATUAM TANTO NOS PRODUTOS DE AMADORI E COMPOSTOS CARBONÍLICOS, QUANTO NOS MONOSSACARÍDEOS. OS COMPOSTOS DEGLICANTES ATUAM DIRETAMENTE NOS AGEs. OS BLOQUEADORES DE SINAIS DE AGEs ATUAM NAS CÉLULAS.



FONTE: Adaptado de EMEL'YANOV, 2010

Entre os derivados aminados, preparações de vitaminas do complexo B e seus derivados (tiamina, benfotiamina, piridoxamina, carnitina e ácido fólico), ácido aminosulfônico, taurina, poliaminas endógenas (espermina, espermidina e

outras), bem como oligopeptídeos (carnosina), exibem atividade antiglicante (AVEMARIA *et al.*, 2012; KULKARNI *et al.*, 2013; SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2014). A aminoguanidina é um dos antiglicantes mais conhecidos no meio científico e frequentemente é usada em experimentos como antiglicante padrão. Entretanto, sua baixa disponibilidade e rápida depuração renal não permitem criar uma concentração suficientemente alta deste composto nos fluidos do organismo (EMEL'YANOV, 2010; EMEL'YANOV *et al.*, 2010; ENGELEN *et al.*, 2013; NENNA *et al.*, 2015).

Deglicantes são denominados na literatura inglesa como *AGE-breakers* ou degradadores de produtos finais de glicação avançada. Há componentes naturais e sintéticos que pertencem a este grupo. A maioria dos dados experimentais trata dos derivados sintéticos de fenilacetiltiazólio, como ALT-711 ou alagebrium, PTB ou brometo de fenilacetiltiazólio (SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2014; YAMAGISHI, 2012; KIM *et al.*, 2013). A eficiência clínica do alagebrium foi estudada de 2000 a 2010. O uso deste componente por 2 a 3 meses em tratamento de pacientes com hipertensão arterial e insuficiência cardíaca crônica resultou na diminuição da pressão de pulso, normalização dos indicadores ecocardiográficos, melhora de função endotelial e qualidade de vida no geral (ENGELEN *et al.*, 2013; NENNA *et al.*, 2015; OUDEGEEST-SANDER *et al.*, 2013). No entanto, observações de 9 a 12 meses em estudo mais longo, mostraram que os efeitos não eram estáveis e não houve diferenças nos níveis de AGEs no sangue frente ao grupo placebo (FUJIMOTO *et al.*, 2013; WILLEMAN *et al.*, 2010).

Polifenóis vegetais, como resveratrol, ácido ferúlico, ácido gálico, epigalocatequina e galato de epigalocatequina (EGCG), bem como uma série de outros compostos de ácidos fenólicos e classes de flavonoides e seus glicosídeos com monossacarídeos naturais, demonstraram ser eficazes na proteção contra a glicação (ELOSTA *et al.*, 2012; SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2014; SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2015). A análise da relação estrutura-função nos polifenóis, os quais são inibidores de glicação, evidenciou que os ácidos polifenólicos apresentaram a maior atividade, cuja redução se deu nos casos em que os grupos hidroxila foram metilados e glicosídeos com monossacarídeos foram formados (XIE *et al.*, 2013). Curcumina, quercetina, ácido cafeico e EGCG demonstraram atividade geroprotetora nos experimentos

com camundongos, *Drosophila melanogaster* e o nematóide *Caenorhabditis elegans* (SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2015).

O ácido rosmarínico, dímero do ácido cafeico, é um polifenol que apresenta particular interesse, uma vez que exhibe inúmeros efeitos biológicos: antioxidante, membranotrópico, radioprotetor e anti-inflamatório (AZAROVA *et al.*, 2010; BUDANTSEV *et al.*, 2012; POPOV *et al.*, 2014). A atividade antioxidante do ácido rosmarínico supera aquelas exibidas por antioxidantes padrão, como diidroquercetina, trolox e ácido ascórbico. O efeito deglicante do ácido rosmarínico *in vitro* foi relatado e superou o ALT-711 na sua capacidade de romper ligações cruzadas na albumina sérica bovina incubada com ribose, enquanto a carnosina e a aminoguanidina não exibiram atividades deglicantes (JEAN *et al.*, 2015). Dos outros polifenóis vegetais derivados do ácido cafeico, o ácido rosmarínico apresenta a maior atividade deglicante e seu efeito geroprotetor se manifestou de modo a aumentar a vida útil de camundongos e do nematóide *Caenorhabditis elegans* durante a modelagem de esclerose lateral amiotrófica (PIETSCH *et al.*, 2011; SHIMOJO *et al.*, 2010; SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2015).

2.4.4. Técnicas analíticas relevantes

Diversos métodos têm sido utilizados para se detectar a ocorrência das reações de glicação e sua inibição frente a substâncias teste. Estes métodos se baseiam na formação de produtos de Amadori e na energia gerada durante o percurso de produção de AGEs e ligações cruzadas. Alguns destes métodos são: cromatografia líquida de alta performance, espectrometria de massa, espectroscopia de fluorescência e outros que utilizam anticorpos com função anti-AGEs. Em muitos destes procedimentos, a albumina de soro bovino, a hemoglobina, as lisozimas e o colágeno são utilizados como alvo tanto para açúcares redutores quanto para componentes carbonílicos reativos, como MG (GUTIÉRREZ, *et al.*, 2010; MUTHENA, *et al.*, 2012; ADISAKWATTANA, *et al.*, 2012; XI, *et al.*, 2008; WEI, *et al.*, 2009; CHOMPOO, *et al.*, 2011). De modo geral, os métodos podem ser divididos em imunoquímicos, como ELISA e WB, e bioanalíticos, como espectroscopia de fluorescência, HPLC, MALDI-ToF e LC-MS (CORICA *et al.*, 2021). Também é mencionado o método TBARS para

averiguação da formação do precursor de ALEs ou produtos de lipoxidação avançada.

2.4.5. Ensaio imunológico

Do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*, ou ELISA, é uma técnica versátil. Há kits comerciais com sensibilidades diferentes disponíveis tanto para se testar AGEs não fluorescentes, como CML e MG, quanto AGEs fluorescentes, como pentosidina. A matriz de medição pode variar entre soro, plasma e outros fluidos ou tecidos biológicos. Devido a sua abordagem simples e rápida, ELISA talvez seja a técnica mais comum utilizada na detecção de AGEs na prática clínica. Normalmente, são empregados modelos competitivos e em sanduíche, sendo a determinação de um complexo anticorpo-antígeno baseada na quimioluminescência, fluorescência ou reação colorimétrica. Por exemplo, a medição de MG se baseia na determinação de MG ligado ao LDL (SAKHAROV *et al.*, 2013).

Os ensaios ELISA empregam anticorpos diferentes para detectar os mesmos AGEs quimicamente definidos, sendo os AGEs ligados a proteínas os principais medidos via ELISA. Desta forma, os métodos cromatográficos permitem a determinação sensível e específica com técnicas mais precisas do que os ensaios imunológicos quantitativos. Geralmente, os níveis plasmáticos de AGEs ensaiados anticorpos monoclonais são semelhantes aos obtidos via anticorpos policlonais. Esforços vêm sendo realizados para se produzir epítopos monoclonais específicos e, então, se alcançar resultados mais relevantes (PERRONE *et al.*, 2020; MUNCH *et al.*, 1997).

WB ou *Western Blot* é considerado um procedimento de rotina que permite identificação de antígenos específicos em amostras de fluidos e tecidos. As proteínas presentes no soro, plasma ou tecidos homogeneizados são primeiramente separadas em géis de poliacrilamida com docecilsulfato de sódio com base no peso molecular, e então eletrotransferidas para membranas de nitrocelulose ou PVDF. Após a incubação com tampão de bloqueio para reduzir a ligação não-específica de anticorpos, as membranas são incubadas com anticorpos contra AGEs e depois com anticorpos secundários, geralmente conjugados com HRP ou corantes fluorescentes para detecção

quimioluminescente ou fluorescente (FREIDJA *et al.*, 2014; MACHAHUA *et al.*, 2016; KRISHNAMOORTHY *et al.*, 2018). Diversos instrumentos e dispositivos estão disponíveis para se obter sinais quimioluminescentes ou fluorescentes úteis na quantificação de AGEs. Entretanto, anticorpos e equipamentos podem ser caros.

Apesar de WB ter alta sensibilidade, produz apenas dados semiquantitativos e os resultados podem ser influenciados pela experiência do usuário. Além disso, anticorpos primários e secundários podem se ligar não especificamente a outras proteínas (PILLAI-KASTOORI *et al.*, 2020). Neste sentido, embora seja amplamente utilizado em pesquisas, não é facilmente aplicado à prática clínica no campo da análise de AGEs.

2.4.6. Ensaio bioanalítico

A detecção via espectroscopia de fluorescência é amplamente utilizada para medição de AGEs de amostras de sangue e saliva, bem como de tecidos como a pele. A quantidade de AGEs fluorescentes pode ser medida em λ_{ex} de 310 nm e λ_{em} de 440 nm em amostras diluídas com solução salina tamponada com fosfato (PBS) a pH 7,4. A intensidade de fluorescência é geralmente expressa em unidades arbitrárias (AU) por mL de soro ou plasma (AU/mL) ou em AU/g de proteína total (CORICA *et al.*, 2019; RUGGERI *et al.*, 2020; RUGGERI *et al.*, 2016; PERRONE *et al.*, 2020; GUERIN-DUBOURG *et al.*, 2017). Embora este método seja caracterizado pela aplicação simples e rápida, ele não consegue detectar a maioria dos AGEs não fluorescentes e sofre interferência de outros fluoróforos na medição global (ASHRAF *et al.*, 2015; STROZECKI *et al.*, 2013).

A espectroscopia de autofluorescência da pele (SAF) é a técnica espectroscópica mais amplamente empregada devido à possibilidade de medição rápida, simples e não invasiva, sendo que estima o acúmulo de AGEs fluorescentes na pele (CORICA *et al.*, 2021). De maneira resumida, o leitor de autofluorescência ilumina 4 cm² da superfície da pele, evitando a luz circundante, com uma fonte de luz de excitação a 370 nm. Os sinais de emissão e excitação refletidos pela pele são medidos na faixa de 300 a 600 nm. A quantidade de fluorescência é calculada dividindo a intensidade de luz média do espectro de

emissão, 420-600 nm, pela intensidade de luz média do espectro de excitação, 300-420 nm, multiplicada por 100 e expressa em unidades arbitrárias. SAF é empregando medindo AGEs com leitores eletrônicos disponíveis comercialmente. Brevemente, uma fonte ilumina a pele do antebraço do paciente via janela de iluminação. Depois, a luz emitida pela pele é medida no leitor de espectrômetro integrado e o valor de fluorescência da pele é exibido na tela, sendo os resultados comparados com aqueles de indivíduos saudáveis. A medição em peles escuras é limitada, pois sofre interferência da melanina e acaba subestimando o teor de AGEs (AHDl *et al.*, 2015).

Evidências recentes destacam a possibilidade de métodos cromatográficos oferecerem excelente sensibilidade e bom desempenho analítico para avaliar o perfil bioquímico de compostos glicados em tecidos e amostras de sangue. Métodos cromatográficos acoplados a espectrometria de massas, como cromatografia líquida-espectrometria de massa em tandem (LC-MS/MS) e GC-MS, têm atraído cada vez mais atenção devido à sua capacidade de separar eficientemente os diferentes compostos resultantes da glicação, gerando mais de 20 AGEs. Entre estes produtos, alguns compostos parecem ser mais relevantes, como CML, CEL, pirralina, pentosidina e MOLD (VISTOLI *et al.*, 2013; AHMAD *et al.*, 2017).

Neste contexto, muita atenção tem sido dada ao desenvolvimento de métodos para dosar a pentosidina, que representa um composto fluorescente formado pela reticulação entre arginina e lisina, que é estável sob hidrólise ácida de proteínas e é detectável em concentrações muito baixas devido à sua característica de fluorescência (ASHRAF *et al.*, 2015). A determinação de pentosidina por fluorescência intrínseca representa uma abordagem simples e tem maior sensibilidade e especificidade em comparação a outros métodos (AHMED *et al.*, 2002).

MALDI-TOF ou *matrix assisted laser desorption/ionization – time of flight* é uma técnica analítica utilizada para diferentes substâncias na qual a amostra é preparada misturando ou revestindo o produto de interesse com um composto orgânico absorvente de energia – esse é o denominado matriz. Quando a matriz cristaliza durante a secagem, o produto aprisionado na matriz co-cristaliza. A amostra dentro da matriz é ionizada de modo automatizado com um feixe de raio laser (SINGHAL *et al.*, 2015; YATES, 1998). A dessorção e a ionização com o

feixe de laser geram íons protonados individualmente a partir dos analitos na amostra. Os íons protonados são, então, acelerados a um potencial fixo, onde se separam uns dos outros com base na sua relação massa-carga (m/z). Os analitos carregados são detectados pelo tempo de voo ou TOF. A razão m/z de um íon é medida determinando o tempo necessário para que ele percorra o comprimento do tubo de voo (SINGHAL *et al.*, 2015; YATES, 1998). Alguns analisadores TOF incorporam um espelho de íons na extremidade traseira do tubo de voo, que serve para refletir os íons de volta através do tubo de voo até um detector. Assim, o espelho iônico não apenas aumenta o comprimento do tubo de voo, mas também corrige pequenas diferenças de energia entre os íons (SINGHAL *et al.*, 2015; YATES, 1998). Para realizar a verificação da glicação é utilizada a EQUAÇÃO 1:

$$N = \frac{MM_{proteína\ glicada} - MM_{proteína\ nativa}}{MM_{açúcar\ redutor}} \quad (1)$$

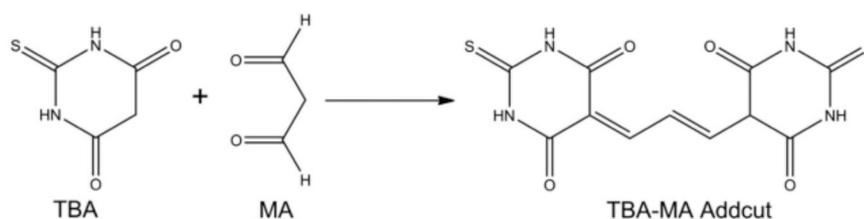
Na qual MM simboliza a massa molar e N é o número de porções de açúcar (GHOSH *et al.*, 2023).

RP-HPLC ou *reversed-phase liquid chromatography* em coluna única vai além dos métodos abordados anteriormente, onde eram necessários sistemas de dupla cromatografia para quantificação precisa de pentosidina (SPACEK *et al.*, 2002; WILKER *et al.*, 2001; SAITO *et al.*, 1997). O RP-HPLC representa um método rápido, simples e sensível que tem sido usado para a determinação de pentosidina ligada a proteínas no plasma, apresentando um limite de detecção de 0,02 pmol/mg de proteína (SCHEIJEN *et al.*, 2009). Os níveis de pentosidina são medidos usando um procedimento de duas etapas, primeiro separando com um gradiente e depois com uma corrida isocrática. Este método elimina as impurezas fluorescentes produzidas durante a hidrólise da proteína e a coeluição com pentosidina. Entretanto, o ensaio cromatográfico tem sido empregado com sucesso para a quantificação de diferentes AGEs, como CML e CEL. A determinação de compostos que não possuem fluorescência nativa normalmente inclui uma etapa de derivatização anterior. Por exemplo, esses compostos foram derivatizados para quinoxalinas fluorescentes, entre outros (AHMED *et al.*, 2002; HURTADO-SANCHEZ *et al.*, 2012).

Nas últimas décadas, diferentes técnicas baseadas na análise LC-MS de produtos de glicação têm sido empregadas. As vantagens essenciais desses

procedimentos são tempos de análise curtos e resolução analítica relativamente alta. A implementação de MS para analisar produtos de glicação de proteínas aumenta drasticamente a sensibilidade, seletividade, precisão e robustez do método para avaliar os níveis de aminoácidos glicosilados individuais (RABBANI *et al.*, 2016; WEI *et al.*, 2017), peptídeos (GREIFENHAGEN *et al.*, 2015) e proteínas (ZHANG *et al.*, 2011). Assim, como para outros biomarcadores (TORMA *et al.*, 2017; ANDREIS *et al.*, 2014), MS poderia ser um método de referência candidato para a quantificação confiável de AGEs específicos, e para o desenvolvimento de calibradores que poderiam ser usados para a padronização de outras técnicas. Por outro lado, esta técnica pode ser considerada um método caro, embora se aumentando o número de dosagens formadas possa resultar na redução de gastos (CORICA *et al.*, 2021). Vale citar que Genuth e colaboradores (2015) realizaram biópsias na pele de jovens pacientes com Diabetes Mellitus tipo 1, relacionando que a presença de AGEs modificadores do colágeno dérmico, como glucosepano e metilglioxal hidroimidazolona, medidos via LC-MS estão fortemente associados ao desenvolvimento deletério (até 17 anos) de retinopatia diabética, nefropatias e neuropatias.

FIGURA 9 - PRINCÍPIO TBA OU TBARS, SENDO MA O ALDEÍDO, OU DIALDEÍDO, MANLÔNICO, E TBA-MA ADDUCT A REPRESENTAÇÃO DOS ADUTOS RESULTANTES



FONTE: XIAO *et al.*, 2020.

O rápido ensaio de TBA ou TBARS (*thiobarbituric acid reactive substances*) utiliza o ácido-2-tiobarbitúrico para interagir com o produto de oxidação lipídica, aldeído malônico, para formar um componente rosa com valor máximo de absorção em 532 nm, conforme apresentado pela FIGURA 9. O resultado do teste é, geralmente, expresso como o produto entre a absorvância a 532 nm e o coeficiente de absorção do aldeído malônico. Este resultado é comumente referido como o valor TBARS, podendo ser representado também como a capacidade de inibição da oxidação lipídica (BROWNLEY; LACHMAN,

1965). Esse ensaio se torna relevante por conta da formação do precursor dos ALEs, aldeído malônico (BARBOSA *et al.*, 2016).

A TABELA 7 apresenta um resumo dos marcadores de cada metodologia com suas respectivas vantagens e desvantagens.

TABELA 7 - VANTAGENS E DESVANTAGENS DAS TÉCNICAS DE DETECÇÃO DE ADUTOS DE GLICAÇÃO E LIPOXIDAÇÃO

MÉTODO	MARCADORES	VANTAGENS	DESVANTAGENS
ELISA	CML, MG, CEL, pentosidina	Simple, uso de equipamento comum de laboratório	Baixa especificidade, baixa reproductibilidade
WB	CML, CEL, MG	Sensibilidade	Dados semiquantitativos, diferenças inter-laboratoriais, necessidade de biópsia tecidual Não detecta AGEs não fluorescentes, interferência de outros fluoróforos, resultados em unidades arbitrárias
Espectroscopia fluorescente	Pentosidina	Simple e rápida aplicação	interferência de outros fluoróforos, resultados em unidades arbitrárias
HPLC	CML, CEL, MG, pirralina, pentosidina, MOLD	Rápida aplicação, sensibilidade e resolução	Equipamento específico, time especializado, derivatização necessária
MALDI-TOF	Inespecífico	Simple e rápida aplicação	Sem especificidade das moléculas formadas, equipamento específico, time especializado
Eletroforese em gel 2D	Inespecífico	Simple e permite a separação de amostras complexas	Não permite analisar a proteína total, sem especificidade da proteína formada
LC-MS/MS	CML, CEL, MG, GO, 3-DG	Sensibilidade, seletividade, precisão, sem etapas de derivação necessárias, análise de alta taxa de transferência	Alto custo, instrumentos especializados, time especializado
TBARS*	Aldeído malônico e espécies não específicas	Simple e rápida aplicação	Sem especificidade das moléculas formadas, baixa reproductibilidade

FONTE: Adaptado de CORICA *et al.*, 2021.

LEGENDA: * Exclusivo para lipoxidação

3 MATERIAL E MÉTODOS

Neste capítulo serão apresentados os materiais e métodos utilizados durante o desenvolvimento deste trabalho. Os ensaios foram realizados nos seguintes laboratórios: Laboratório de Termodinâmica e Operações de Separação (UFPR), Laboratório de Reologia e Emulsões (UFPR), Laboratório de Tecnologia em Alimentos (UFPR), Laboratório Multiusuários de Equipamentos e Análises Ambientais (UTFPR), Laboratório de Microbiologia (UTFPR), Laboratório de Bioquímica e Biologia Molecular (UFPR), Laboratório Multiusuário de Análises Químicas (UTFPR), Laboratório de Pesquisa e Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição (UFPR), Laboratório de Análise Cinética e Termodinâmica (LACTA).

3.1 MATERIAL

A TABELA 8 apresenta os reagentes utilizados durante as etapas de preparo e análise. Todos os reagentes apresentaram alto grau de pureza. As gemas dos ovos utilizados na análise anti-lipoxidação foram adquiridos em mercado local, fabricados por Katayama Alimentos Ltda, Unidade de Beneficiamento de Ovos e Derivados, Rod. Marechal Rondon km 557 – Guararapés, SP, CEP 16700-000; CNPJ 47.765.979/0001-52; IE 330.005.110.110. Indústria Brasileira. Registro no Ministério da Agricultura SIF/DIPOA sob nº 0153/1987. Foram homogeneizadas gemas de 3 ovos diferentes previamente ao uso. TABELA 9 apresenta as cepas de bactérias.

TABELA 8 - LISTA DE REAGENTES

(continua)

REAGENTE	MASSA MOLAR	Nº DO CAS	PUREZA	MARCA
Acetato de Etila	88,11	141-78-6	99,5%	Neon
Acetona	58,08	67-64-1	-	Neon
Ácido Acético Glacial	60,05	64-19-7	99,8%	Neon
Ácido Trifluoroacético	114,02	76-05-1	≥99,9%	Êxodo Científica
Acetonitrila	41,05	75-05-8	≥99,9%	Neon
Ácido Clorídrico	36,46	7647-01-0	37%	Anidrol
Ácido Gálico	170,12	149-91-7	≥99,0%	Sigma-Aldrich
Ácido Nítrico	63,01	7697-37-2	65%	Neon
Ácido Rosmarínico	360,31	20283-92-5	≥99,0%	Sigma-Aldrich
REAGENTE	MASSA MOLAR	Nº DO CAS	PUREZA	MARCA

Ácido Sulfúrico	98,08	7664-93-9	≥99,0%	Neon
Ácido Tiobarbitúrico	144,15	504-17-6	≥99,0%	Êxodo Científica
Ágar Muller Hinton	-	-	-	Kasvi
Albumina de Soro Bovino	-	9048-46-8	-	Sigma-Aldrich
Alfa-amilase	-	9000-85-5	-	Sigma-Aldrich
Amiloglucosidase	-	9032-08-0	-	Sigma-Aldrich
Amoxicilina	-	-	-	EMS
Azida Sódica	65,01	26628-22-8	-	Neon
Butanol	74,12	71-36-3	≥99,0%	Neon
Carbonato de Sódio	105,99	497-19-8	99%	Nuclear
Catequina	290,27	154-23-4	≥99,0%	Sigma-Aldrich
Cloreto de Potássio	74,55	7447-40-7	-	Synth
Cloreto de Sódio	58,44	7647-14-5	99,0%	Êxodo Científica
D-frutose	180,16	57-48-7	-	Synth
Diclorometano	84,93	75-09-2	99,8%	Êxodo Científica
Dimetilsulfóxido	78,13	67-68-5	≥99,0%	Neon
DPPH	394,32	1898-66-4	-	Sigma-Aldrich
Etanol	46,07	64-17-5	≥99,5%	CRQ
Éter de Petróleo	-	101316-46-5	-	Neon
Folin Ciocalteau	-	-	-	Sigma-Aldrich
Fosfato de Potássio Monobásico	136,09	7778-77-0	-	Synth
Fosfato de Sódio Bibásico	268,07	7558-79-4	-	Synth
Hexano	86,18	110-54-3	95%	Neon
Peróxido de Hidrogênio	34,01	7722-84-1	35%	Êxodo Científica
Protease	-	9014-01-1	-	Sigma-Aldrich
Solução Mc Farland	-	-	-	Bio Mérieux
Sulfato Ferroso	278,01	7782-63-0	99%	Sigma-Aldrich
Tris-HCl	157,60	1185-53-1	≥99,0%	Sigma-Aldrich
Trolox	250,29	53188-07-1	97,0%	Sigma-Aldrich

FONTE: O autor (2024).

TABELA 9 - LISTA DE BACTÉRIAS

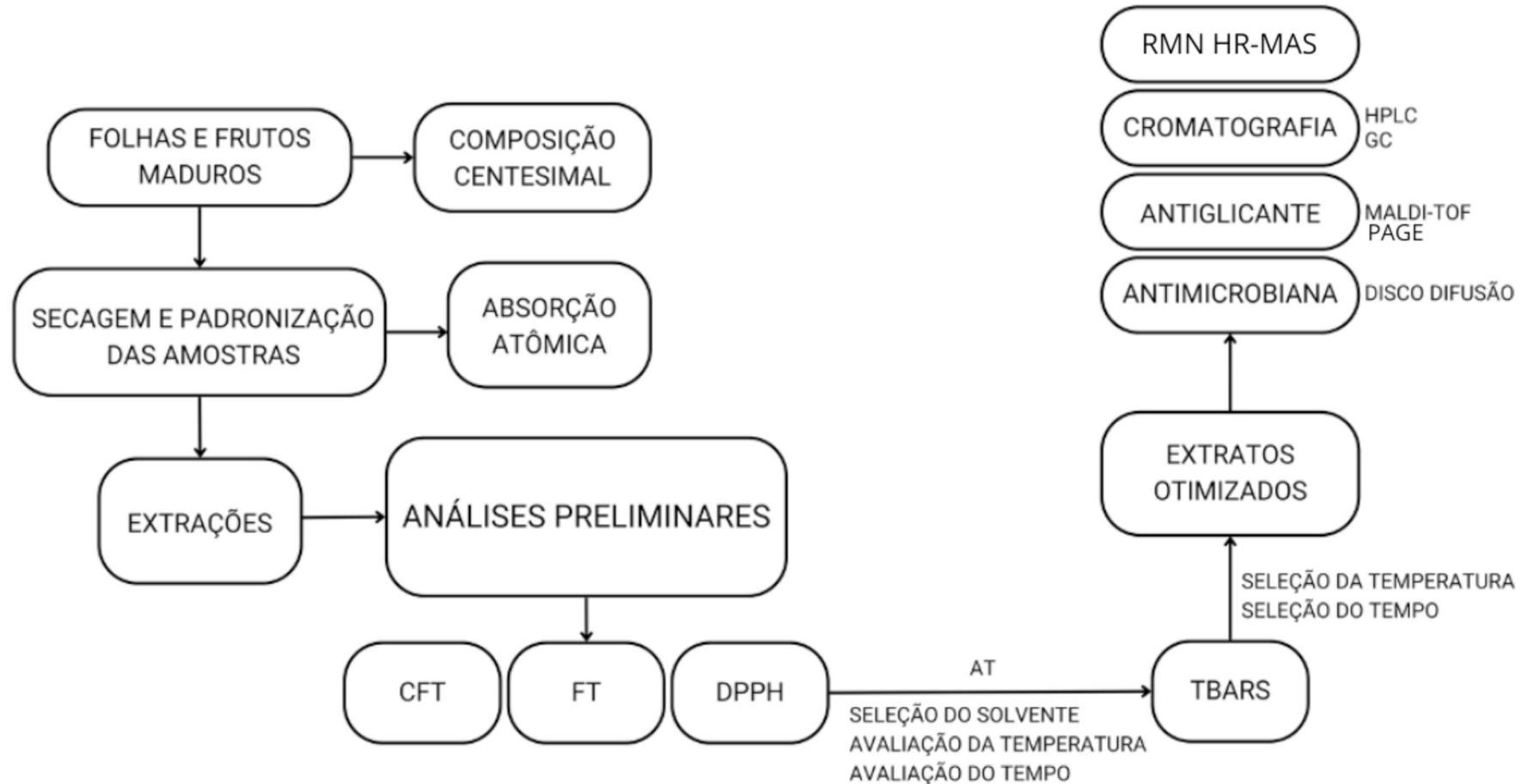
BACTÉRIAS	MARCA
<i>Escherichia coli</i>	ATCC® 25922TM
<i>Staphylococcus aureus</i>	ATCC® 25923TM

FONTE: O autor (2024).

3.2 MÉTODOS

A FIGURA 10 apresenta visão geral dos experimentos que foram realizados para que o objetivo proposto fosse atingido.

FIGURA 10 - DIAGRAMA DE BLOCOS DAS PRINCIPAIS ETAPAS DURANTE A OBTENÇÃO DOS EXTRATOS DE ORA-PRO-NÓBIS E AVALIAÇÃO DE SUAS PROPRIEDADES BIOLÓGICAS



FONTE: O autor (2024).

3.2.1. Matéria prima: obtenção e preparo

Tanto as folhas quanto os frutos de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) foram obtidos a partir da mesma fonte e coletados na mesma data de 25/10/2022: Arroio das Tocas, Papagaios Novos, Palmeira, Paraná, Brasil (S - 25° 041' 141" e W -50° 024' 759"), cadastro SisGen A5F09C2, exsicata UPCB 106378; código 0057367. Após a coleta, as folhas foram higienizadas e secas em estufa com circulação de ar (FABBE) a 45°C durante 24 horas. Em seguida, foram moídas em moinho de facas e peneiradas em malha de 20 *mesh*. O pó obtido (FIGURA 17) foi armazenado a vácuo em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD), sendo mantidos refrigerados (4°C) ao abrigo da luz até o momento das extrações. Os frutos foram higienizados e secos a temperatura ambiente antes da retirada manual dos espinhos. Depois foram congelados a -6°C e liofilizados em equipamento disponível (Liobras, Liotop L101, Brasil), moídos em moinho de facas e peneirados em malha de 20 *mesh*. O pó obtido (FIGURA 11) foi armazenado a vácuo em sacos plásticos de polietileno de baixa densidade (PEBD), sendo mantidos refrigerados (-6°C) ao abrigo da luz até o momento das extrações.

FIGURA 11 - AMOSTRAS SECAS: FRUTOS E FOLHAS, RESPECTIVAMENTE



FONTE: O autor (2024).

3.2.2. Composição centesimal

Conforme apresentado na FIGURA 10, a composição centesimal foi realizada com as folhas e frutos in natura. As quantificações foram realizadas

para as seguintes variáveis, sendo o teor de carboidratos avaliado pela diferença:

- Umidade e cinzas – secagem direta da amostra em estufa a 105°C até massa constante, monitorada com o auxílio de balança analítica. Em seguida, a amostra é colocada em forno tipo Mufla a 550°C durante aproximadamente 2 horas. Os resultados são expressos em porcentagem (IAL, 2008);
- Lipídeos ou extrato etéreo – extração direta em extrator tipo *Soxhlet* utilizando éter de petróleo (IAL, 2008);
- Proteínas – utilizado o processo de digestão de Kjeldahl com ácido sulfúrico, o qual consiste na decomposição da matéria orgânica convertendo o nitrogênio (N) presente em amônio. O teor de proteína bruta ou PB foi determinado através da multiplicação de N pelo fator de conversão (AOAC, 2005);
- Fibras – determinação através de método enzimático-gravimétrico de descrito pela AOAC (2005) como número 985.29.

3.2.3. Perfil mineral

A determinação dos minerais se deu pela metodologia proposta por Oliveira e Naozuka (2021) através da técnica de espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) com adaptações. As massas das amostras secas pesadas foram colocadas em tubos de microondas de digestão. Foi adicionado 6 mL de HNO₃ 65% e 1 mL de H₂O₂ 30%. A digestão foi realizada em forno de microondas com uma rampa de aquecimento inicial até 100°C e uma segunda rampa até 190°C permanecendo nessa temperatura por 5 minutos. Após digestão foram avolumadas para 25 mL e analisadas no FAAS da marca Avanta, modelo GBC. As lâmpadas utilizadas foram para cádmio, chumbo, alumínio, ferro, manganês, magnésio, cromo, zinco, cobre, níquel e cálcio. Os metais sódio e potássio foram analisados no fotômetro de chama da marca Digimed, modelo DM61. Os parâmetros constantes utilizados foram: tempo de leitura de 3,0 segundos, triplicata, chama de ar-acetileno (para alumínio N₂O-acetileno), ângulo de queima 0°, calibração linear, fluxo oxidante 16,6 l/min (para alumínio 13,9 l/min). A TABELA 10 apresenta os parâmetros variáveis utilizados.

TABELA 10 - PARÂMETROS PARA ABSORÇÃO ATÔMICA

METAL	FLUXO DE COMBUSTÍVEL	CORRENTE DA LÂMPADA	COMPRIMENTO DE ONDA	LARGURA DA FENDA
Pb	1,34 l/min	5 mA	283,3 nm	0,5 nm
Al	4,52 l/min	10 mA	396,2 nm	0,5 nm
Fe	1,34 l/min	7 mA	248,3 nm	0,2 nm
Mn	2,00 l/min	5 mA	279,8 nm	0,2 nm
Mg	2,00 l/min	3 mA	202,6 nm	1,0 nm
Cr	1,34 l/min	6 mA	357,9 nm	0,2 nm
Zn	2,00 l/min	5 mA	213,9 nm	0,5 nm
Cu	2,00 l/min	3 mA	324,7 nm	0,5 nm
Ni	1,34 l/min	4 mA	341,5 nm	0,2 nm
Ca	2,00 l/min	5 mA	422,7 nm	0,5 nm
Co	1,34 l/min	6 mA	240,7 nm	0,2 nm
Cd	1,34 l/min	3 mA	228,8 nm	0,5 nm

FONTE: O autor (2024).

3.2.4. Extração dos compostos bioativos

A ESL assistida por dispersor de alto cisalhamento (Ultra Turrax operando a 5000 rpm) foi realizada com razão mássica 1:20 (m/m) em células encamisadas revestidas com papel alumínio. As temperaturas foram mantidas por banho termostático utilizando bomba rotativa e termômetro. Os solventes utilizados foram etanol puro e uma mistura 70/30 de etanol/água destilada. Tanto os solventes quanto as amostras foram pesados em balança analítica (Mettler Toledo, modelo AL204). As suspensões obtidas foram centrifugadas a 10000 rpm durante 5 minutos (Thermo Scientific – Heraeus fresco 21) até total separação dos sólidos. O sobrenadante foi coletado e armazenado sob refrigeração ao abrigo da luz por no máximo 24 horas após a coleta. Em sequência, cada uma das soluções foi submetida à rotaevaporação para

remoção do etanol. O equipamento operou a pressão aproximada de -600 mmHg, temperatura de 35°C e 20 rpm. A FIGURA 12 apresenta o rotaevaporador. Depois, os extratos aquosos resultantes das extrações hidroalcoólicas foram congelados e levados a um liofilizador para remoção da água. Todo os extratos secos obtidos foram colocados em tubos Falcon protegidos por papel alumínio e congelados a -6°C até o momento das análises.

FIGURA 12 - ROTAEVAPORAÇÃO PARA PRODUÇÃO DE EXTRATO



FONTE: O autor (2024).

A eficiência do processo de obtenção de extratos ricos em compostos bioativos está vinculada aos parâmetros de tempo, temperatura, técnica de extração, solvente e proporção solvente/soluto. Para todas as análises descritas a seguir, foram também avaliados o potencial dos solventes puros, de forma que o valor encontrado foi considerado como branco e descontado para que o resultado obtido representasse apenas o extrato em questão.

Inicialmente, foi avaliado o potencial de extração com base nas análises de compostos fenólicos totais (CFT), flavonoides totais (FT), antocianinas monoméricas totais (AT) e atividade antioxidante via DPPH. As extrações foram realizadas em 6 blocos:

1. Tempo fixo de 5 minutos a 25°C, 45°C e 65 °C. Solvente 1;
2. Tempo fixo de 10 minutos a 25°C, 45°C e 65 °C. Solvente 1;
3. Tempo fixo de 15 minutos a 25°C, 45°C e 65 °C. Solvente 1;
4. Tempo fixo de 5 minutos a 25°C, 45°C e 65 °C. Solvente 2;
5. Tempo fixo de 10 minutos a 25°C, 45°C e 65 °C. Solvente 2;
6. Tempo fixo de 15 minutos a 25°C, 45°C e 65 °C. Solvente 2.

Os resultados obtidos a partir das análises mencionadas evidenciaram o solvente com maior capacidade de extração e sugeriram as melhores condições de tempo e temperatura. Uma vez que o principal foco do presente trabalho está nas capacidades biológicas vinculadas à inibição dos processos de glicação e lipoxidação, o ensaio de atividade anti-lipoxidação via TBARS foi realizado para todos os extratos obtidos com o solvente de melhor desempenho.

A partir dos resultados da análise de TBARS, foram determinadas as condições ideais de tempo e temperatura de extração. Então foram verificadas as atividades antiglicante via MALDI-TOF e antimicrobiana via técnica de disco difusão dos extratos otimizados. Por fim, foram realizadas as análises de composição via cromatografia e ressonância magnética nuclear para sólidos.

3.2.5. Análise do potencial dos extratos

Os extratos foram avaliados quanto ao conteúdo de compostos fenólicos totais (CFT) empregando a metodologia proposta por Singleton e Rossi (1965). A curva de calibração é preparada com ácido gálico variando as concentrações de 0 a 100 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. O método consiste em adicionar em tubos eppendorf 600 μL de água ultrapura (Milli-Q), 50 μL do reagente Folin-Ciocalteau, 200 μL dos extratos de *Pereskia aculeata* Miller diluídos em água ultra pura (1:10 v.v⁻¹) e 150 μL de solução de carbonato de sódio a 15%. A partir daí, a amostra é agitada em vórtex e mantida em repouso ao abrigo da luz durante 1 hora. Por fim, a leitura deve ser realizada em comprimento de onda de 760 nm em espectrofotômetro. O equipamento utilizado foi uma leitora de microplacas Epoch, Biotek, USA. Os resultados foram expressos em mg de ácido gálico por g de amostra.

A determinação de flavonoides foi feita de acordo com a metodologia descrita por Zhishen et al. (1999). A técnica se baseia na medida da absorvância a 510 nm do complexo formado entre o flavonoide e o alumínio do reagente de cor. A curva de calibração é preparada com catequina com as concentrações variando de 0 a 1000 $\mu\text{g. mL}^{-1}$. O método consiste em adicionar em tubos eppendorf 400 μL de água ultrapura (Milli-Q), 100 μL dos extratos de *Pereskia aculeata* Miller, 30 μL de nitrito de sódio 5%, aguardar 5 minutos, e, em seguida adicionar 60 μL de cloreto de alumínio 10% e aguardar 6 minutos. Adicionar 200 μL de hidróxido de sódio 1 mol/L e 210 μL de água ultrapura (Milli-Q). Aguardar mais 5 minutos e ler em 510 nm. O equipamento utilizado foi uma leitora de microplacas Epoch, Biotek, USA. Os resultados foram expressos em mg de catequina por g de amostra.

Para quantificar antocianinas monoméricas totais foi realizado conforme a metodologia do pH diferencial proposta por Giusti e Wrolstad (2001). A obtenção se dá a partir das leituras em 515 nm e 700 nm para os pHs de 1,0 e 4,5. A EQUAÇÃO 2 apresenta o cálculo a ser realizado.

$$AT \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \text{cianidina} - 3 - \text{glucosídeo} \right) = \frac{A \cdot MM \cdot FD \cdot 1000}{e \cdot d} \quad (2)$$

Sendo MM massa molar de cianidina-3-glucosídeo (449,20 g/mol), FD o fator de diluição (1 mL de amostra em balão de 5 mL = diluído 5 vezes), d é o percurso ótico (1 cm), e é a absortividade molar (26.900) e $A = (Abs_{515 \text{ nm}} - Abs_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 1,0} - (Abs_{515 \text{ nm}} - Abs_{700 \text{ nm}})_{\text{pH } 4,5}$. O método consiste em se adicionar 1 mL de amostra pura em um balão volumétrico de 5 mL e completar o balão com 4 mL de solução tampão pH 1,0. Aguardar 15 minutos com o balão protegido da luz e realizar a leitura a 515 nm e 700 nm. Isso é feito para a solução tampão pH 4,5. O equipamento utilizado foi um espectrofotômetro UV-visível (BEL Photonics 2000 UV, Brasil). Os resultados foram expressos em mg de cianidina-3-glucosídeo por g de amostra.

A atividade antioxidante foi determinada a partir da técnica de DPPH (2,2-difenil-1-picril-hidrazil) conforme proposto por Brand-Williams e colaboradores (1995). A estabilização do radical livre DPPH através da ação do antioxidante promove a mudança de coloração da amostra de violeta escuro para violeta claro

indicando a atividade antioxidante do composto. A solução DPPH é preparada a partir de 3,95 mg de DPPH, 50 mL de etanol e 50 mL de solução tampão de fosfato de sódio monobásico (50 mM, pH 6,0). O método consiste em adicionar em tubos 1,95 mL de solução DPPH e 50 μ L dos extratos de *Pereskia aculeata* Miller diluídos em água (1:10 v.v⁻¹). Em seguida, a amostra é agitada em vórtex e incubada por 30 minutos ao abrigo da luz. Após a incubação, as amostras devem ser submetidas à leitura em espectrofotômetro em comprimento de onda de 517 nm. A curva padrão de calibração é construída variando a concentração da solução padrão de trolox de 0,03 a 1,60 mmol. mL⁻¹. O equipamento utilizado foi uma leitora de microplacas Epoch, Biotek, USA. Os resultados foram expressos em mmol de trolox por g de amostra.

A atividade anti-lipoxidação se deu pela metodologia proposta por Sabir e colaboradores (2020), que foi adaptada de Khaliq e colaboradores (2015), com algumas modificações. O método consiste em pesar 100 mg de gema de ovo homogeneizada e diluída a 1000 μ L com 100 mM Tris-HCl (pH 7,4). Homogeneizar em vórtex e colocar na centrífuga a 10000 rpm por 10 minutos. Coletar 100 μ L do sobrenadante e dispor em eppendorf juntamente com ou sem 50 μ L de sulfato ferroso 2 mol. L⁻¹, 100 μ L (1,5 mg. mL⁻¹) do extrato de *Pereskia aculeata* Miller e água ultrapura (Milli Q) suficiente para completar 300 μ L. Homogeneizar em vórtex e levar à estufa por 1 hora a 37°C. Adicionar 600 μ L de solução de ácido acético pH 3,4 e 600 μ L de solução de ácido tiobarbitúrico 0,02 M, e homogeneizar em vórtex. Levar os tubos a 97°C em banho-maria durante 1 hora. Aguardar atingir a temperatura ambiente e diluir com 2 mL de butanol. Homogeneizar em vórtex novamente. Centrifugar durante 10 minutos a 10000 rpm, coletar 1 mL de sobrenadante e realizar a leitura em espectrofotômetro a 532 nm. O equipamento utilizado foi Shimadzu UV-1700. O valor da absorvidade utilizado foi de 0,155 L. mol⁻¹. cm⁻¹ e os resultados foram expressos em mol TBARS. L⁻¹ e % de inibição.

Para avaliar o potencial antimicrobiano foi utilizada a técnica de disco difusão conforme a metodologia proposta por *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2007) com algumas modificações. A reativação das bactérias foi realizada em caldo Mueller Hinton seguida de plaqueamento em ágar Mueller Hinton. Os extratos testados foram transferidos para solução salina (0,85%) até

que a concentração de 10^8 UFC mL⁻¹ seja alcançada. O método consiste em adicionar 20 µL do extrato diluído em discos brancos estéreis e depositar sobre as placas contendo 25 mL de ágar Mueller Hinton e os microrganismos inoculados (10^8 UFC mL⁻¹). Para o controle positivo é adicionada solução de amoxicilina em discos brancos estéreis sobre as placas. Para o controle negativo, é incorporado o solvente puro utilizado na dissolução dos extratos (DMSO). Após a inoculação dos extratos e controles positivos e negativos, as placas são incubadas invertidas em estufa a 37°C durante 24 horas. A determinação do potencial do extrato quanto à atividade antimicrobiana é verificada através dos tamanhos dos halos inibitórios utilizando paquímetro digital. As bactérias avaliadas foram *Escherichia coli* e *Staphylococcus aureus*.

A glicação da albumina de soro bovino (BSA) foi realizada a partir da metodologia proposta por Matsuura e colaboradores (2002) modificada por Wijetunge e colaboradores (2014) com adaptações. O método consiste em adicionar BSA (10 mg. mL⁻¹) em solução tampão de fosfato salino (pH 7,4), azida de sódio como bacteriostático (0,02% m.v⁻¹) e açúcares redutores, sendo esses glicose, frutose ou ribose (90 mg. mL⁻¹). As amostras são incubadas na ausência e presença dos extratos de interesse (5 mg. mL⁻¹), e padrão de aminoguanidina (10 mM), a 37°C durante 31 dias com coletas realizadas em períodos variados. Neste trabalho, frutose foi utilizada como açúcar redutor e o processo de incubação se deu durante 5 dias. A aminoguanidina foi substituída por ácido rosmarínico (100 µg. mL⁻¹) cuja ação antiglicante já é validada (ALRUBAYE *et al*, 2021; OU *et al*, 2017). A ressuspensão dos extratos (1,5 mg. mL⁻¹) se deu em dimetilsulfóxido conforme realizado por Vasarri e colaboradores (2020) e foi incluída uma amostra no ensaio apenas para verificar a interferência do solvente.

A verificação da atividade antiglicante se deu através da metodologia proposta por Zhang e colaboradores (2015) com modificações. A técnica consiste em analisar a espectrometria de massas por MALDI-TOF no modo linear positivo. É utilizada matriz α -Cyano-4-hydroxycinnamic acid saturada em 50% de acetonitrila e 0,1% TFA (ácido trifluoroacético). Inicialmente, 1 µL de amostra é misturado com 1 µL da matriz e depositado na superfície da placa do tipo *MTP 384 polished steel* (Bruker Daltonics) e deixado secar a temperatura ambiente. A calibração é feita utilizando padrões comerciais de ACTH (do inglês

adrenocorticotropic hormone), insulina e apomioglobina. O equipamento utilizado foi um Autoflex maX MALDI-TOF Bruker. Conforme Ghosh e colaboradores (2023) os resultados são expressos em número de adutos de açúcar ligados à proteína (N). Também foi realizado o cálculo de índice de redução da massa da proteína glicada conforme a comparação com os espectros apresentados.

As amostras ainda foram analisadas utilizando eletroforese em gel de poli(acrilamida) (PAGE) sob condições não-desnaturantes (gel em condições nativas) de acordo com a metodologia proposta por Araújo (2003). As amostras utilizadas nos experimentos foram diluídas em tampão contendo 50 mM Tris-HCl pH 6,8, 20% glicerol e 0,005% azul de bromofenol. Foi utilizado gel de empilhamento contendo acrilamida 4%, 0,0625 M Tris-HCl, pH 6,8, 5 µL de TEMED, persulfato de amônio 0,05% (m/v), 0,0625% Nonidet P40 (v/v). A concentração do gel separador foi de 7,5% de acrilamida (acrilamida/bis 9/0,24), 0,45 M Tris-HCl, pH 8,8, 5 µL de TEMED, 0,05% de persulfato de amônio (m/v), 0,025% Nonidet P40 (v/v). As eletroforeses foram realizadas a 100 V por 4 horas, em tampão contendo Tris base e glicina (tampão 1x: Tris 3 g/L; glicina 14,4 g/L), em um sistema de minigéis BioRad. Mudanças nas posições de migração das bandas foram comparadas.

Para a cromatografia em fase líquida acoplada a detector DAD foi utilizada coluna do modelo ACCLAIM 120 C18 250 x 6 mm 5 µ. Fase móvel H₃PO₄ pH 2,15 (A) e acetonitrila (B), vazão de 1,0 mL/min, gradiente de concentração para fenólicos 0 min 2% B, 30 min 8% B, 50 min 30% B, 52 min 2% B, 62 min 2% B; gradiente de concentração para flavonoides 0 min 2% B, 50 min 25% B, 70 min 30% B, 72 min 2% B, 78 min 2% B. Temperatura de 35°C, volume injetado de 10 µL. A TABELA 11 apresenta os tempos de retenção e os comprimentos de onda para os compostos bioativos.

Para a cromatografia em fase gasosa, 10 mg de cada amostra foram diluídos em 10 mL de acetato de etila grau HPLC. As soluções resultantes foram microfiltradas e 1 µL de cada foi injetado no cromatógrafo. A separação foi realizada utilizando coluna SLB-5MS (25 µm de espessura, 0,25 mm de diâmetro e 30 m de comprimento), temperatura do forno de 80°C, temperatura de injeção de 250°C, modo de injeção splitless e tempo de amostragem de 1 minuto. Hélio

foi utilizado como gás de arraste, o modo de controle de fluxo foi velocidade linear (36,5 cm/s), pressão de 63,7 kPa, fluxo total 4 mL/min, fluxo da coluna 0,98 mL/min, fluxo de purga 3 mL/min . Tempo de espera 3 min a 80°C e 4 min a 280°C. O tempo total do programa foi de 47 min. A configuração do MS foi de 4,5 min de tempo de início, 47,0 min de tempo de término, modo de aquisição Q3 Scan, velocidade de varredura de 1250, tempo de evento de 0,3 s, início m/z 40,0 e fim m/z 400,0. Temperatura da fonte de íons 270°C, temperatura da interface 280°C e tempo de corte do solvente de 4 min.

O preparo das amostras para a ressonância magnética nuclear RMN - HR MAS de ^1H se deu através do resfriamento com nitrogênio líquido e posterior pulverização manual em um almofariz de porcelana. Para cada análise a quantidade indicada de amostra foi empacotada em um rotor de ZrO_2 , com volume de 50 μL . Em seguida, foi adicionado 45 μL de CD_3OD (metanol deuterado) contendo 0,05% de TMS (tetrametilsilano). Os experimentos foram realizados com uma velocidade de giro do rotor de 5 kHz. Os espectros foram adquiridos em um espectrômetro Bruker Avance 400 (9,4 T) observando o núcleo de ^1H a 400 MHz, equipado com uma sonda quadrinuclear de alta resolução de 4 mm MAS, com gradiente de campo na direção do ângulo mágico ($\theta=54,74^\circ$) a 298 K. Os espectros foram processados com o software TopSpin (Bruker BioSpin Inc.), utilizando multiplicação exponencial nos FIDs por um fator de 0,3 Hz. As fases foram corrigidas manualmente e as linhas de base automaticamente.

3.2.6. Análise estatística dos dados

O tratamento estatístico foi realizado no software Statistic 7 (StatSoft USA). Os dados foram submetidos a análise de variância ANOVA unidirecional (*one way*) seguido pelo teste de Tukey, considerando $p < 0,05$ significativo a nível de comparação. Todos os resultados foram apresentados utilizando a média de três replicadas independentes \pm desvio padrão (DP).

TABELA 11 - PARÂMETROS PARA CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA

COMPOSTO BIOATIVO	TEMPO DE RETENÇÃO (min)	COMPRIMENTO DE ONDA (nm)
FENÓLICOS		
ÁCIDO GÁLICO	10,078	271
ÁCIDO VANÍLICO	35,562	256; 292
ÁCIDO CLOROGÊNICO	37,407	326
ÁCIDO CAFEICO	38,062	323
ÁCIDO SIRÍNGICO	39,479	274
ÁCIDO CUMÁRICO	44,116	309
ÁCIDO FERÚLICO	46,526	322
FLAVONOIDES		
CATEQUINA	23,956	280
PROCIANIDINA	27,549	280
CIANIDINA	28,657	516
RUTINA	40,883	241
ISOQUERCETINA	42,255	280
QUERCETINA	60,638	370

FONTE: O autor (2024).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Neste capítulo são abordados os resultados obtidos através da extração de compostos bioativos das folhas e frutos maduros de *ora-pro-nobis*. A fim de se determinar a composição básica da matéria-prima in natura foi realizada a caracterização físico-química seguida do processo de secagem e espectrofotometria de absorção atômica em chama. Depois, foram realizadas as extrações com duas opções de solventes comumente empregados para posterior seleção de um deles e a otimização dos parâmetros de tempo e temperatura através das análises de compostos fenólicos totais, flavonoides totais, atividade antioxidante via DPPH e atividade anti-lipoxidação via TBARS. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

Após a determinação dos melhores parâmetros de extração em relação aos biocompostos e atividades biológicas de interesse, os extratos foram submetidos às análises de atividade antimicrobiana via técnica de disco difusão, atividade antiglicante via MALDI-TOF, composição por cromatografia em fase líquida e ressonância magnética nuclear para sólidos. A composição do extrato otimizado das folhas também foi verificada via cromatografia em fase gasosa.

4.1 COMPOSIÇÃO CENTESIMAL

A TABELA 12 apresenta a composição em base seca, sendo que o teor de carboidratos foi determinado por diferença. Vale citar que a umidade aqui encontrada foi de $85,92 \pm 0,16$ (%) para as folhas e $92,78 \pm 2,01$ (%) para os frutos. Observando os resultados deste trabalho, cerca de um quarto das folhas (24,33%) e pouco mais de um terço (35,27%) dos frutos corresponde a fibra alimentar, seguido de proteínas (22,07% e 15,14%), cinzas (20,70% e 10,57%) e lipídeos (3,27% e 4,42%). A fibra alimentar é advinda de matrizes vegetais e pode ser dividida quanto à solubilidade em água (DHINGRA *et al.*, 2012).

As fibras solúveis correspondem à pectina, às gomas e mucilagens, e as fibras insolúveis compreendem celulose, hemicelulose e lignina (FENNEMA *et al.*, 2008). A ingestão de fibra alimentar está relacionada à regulação do pH intestinal, redução do colesterol total, minimização do risco de doenças cardíacas e alívio da constipação (DHINGRA *et al.*, 2012). A contribuição benéfica da ingestão regular de fibras de *ora-pro-nobis* pode ser comprovada

através do enriquecimento da ração de ratos Wistar com 30% de farinha das folhas (BARBALHO *et al.*, 2016).

Durante o manuseio para posterior processamento dos frutos e folhas neste trabalho, a quantidade de fibras solúveis e carboidratos (mucilagem) percebida nos frutos foi mais representativa do que nas folhas. O comparativo entre o teor de fibras solúveis (FS) e insolúveis (FI) em diversas cactáceas foi documentado e se apresenta na TABELA 13.

Observando os resultados da TABELA 13, é notável que a polpa de pêra de cacto apresenta maior teor de fibras solúveis em comparação à casca que é mais rica em fibras insolúveis. É perceptível ainda que nos frutos de pitáia cujos teores de fibras foram quantificados com os frutos inteiros, ou seja, incluindo a polpa e a casca, a proporção entre fibras solúveis e insolúveis fica mais próxima de 1,0:0,9 para a variedade amarela e 1,0:0,7 para a variedade vermelha. Quando se avalia os valores para as folhas de ora-pro-nóbis, a proporção de fibras insolúveis é muito mais representativa, sendo pelo menos 6 vezes maior do que as fibras solúveis, sugerindo que de fato os frutos de ora-pro-nobis sejam mais ricos em fibras solúveis do que as folhas. Em estudo anterior foi descrito que o fruto é constituído morfologicamente por hipanto, pericarpo e sementes envoltas por material gelatinoso (ROSA, 2003), cuja aparência denota a presença considerável de mucilagens. A FIGURA 13 apresenta um dos frutos usados neste trabalho.

FIGURA 13 - FRUTO ABERTO DE ORA-PRO-NÓBIS



FONTE: O autor (2024).

TABELA 12 - COMPOSIÇÃO EM BASE SECA

COMPOSIÇÃO	PROTEÍNAS	CINZAS	LIPÍDEOS	FIBRAS	CARBOIDRATOS
FOLHAS	22,07 ± 0,08	20,70 ± 0,48	3,27 ± 0,01	24,33 ± 0,12	29,62
FRUTOS	15,14 ± 0,12	10,57 ± 0,46	4,42 ± 0,37	35,27 ± 0,10	34,60

FONTE: O autor (2024).

TABELA 13 - COMPARATIVO ENTRE FIBRAS SOLÚVEIS E INSOLÚVEIS

	OPN	OPN	PA	PV	PCP	PCC
FS ^a	5,20 ± 0,00	7,14 ± 1,49	29,16 ± 3,88	22,91 ± 4,65	12,40 ± 0,30	17,40 ± 0,70
FI ^a	33,90 ± 0,00	43,40 ± 0,95	33,25 ± 3,74	34,34 ± 0,25	4,20 ± 0,30	28,20 ± 0,80
REFERÊNCIA	SANTOS, 2019	RODRIGUES, 2016	MORAIS et al, 2020	MORAIS et al, 2020	JIMÉNEZ- AGUILAR et al, 2015	JIMÉNEZ- AGUILAR et al, 2015

FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: FS^a (g de fibras solúveis.100g⁻¹ de amostra seca)

FI^a (g de fibras insolúveis.100g⁻¹ de amostra seca)

OPN (folhas de ora-pro-nóbis)

PA (pitaia amarela)

PV (pitaia vermelha)

PCP (polpa de pêra de cacto da variedade Rojo cenizo)

PCC (casca de pêra de cacto da variedade Rojo cenizo)

É sabido que mucilagens são polissacarídeos complexos, grandes, ramificados e solúveis em água, e, em sua maioria, são formados por monossacarídeos, ácidos urônicos, glicoproteínas e bioativos (CAKMAK *et al.*, 2023). As frações proteicas e de fibras dietéticas das mucilagens contêm propriedades hidrofílicas e gelificantes, enquanto as frações lipídicas possuem capacidade de retenção de óleo (CHIANG *et al.*, 2021). É possível correlacionar essas informações com os teores de fibras (35,27%), carboidratos (34,60%), umidade (92,78%) e lipídeos (4,42%) dos frutos, que também são mais representativos do que os teores das folhas.

Ao avaliar o obtido para proteínas das folhas neste trabalho e comparando com o apresentado na TABELA 1 do item 2, é perceptível que de fato o conhecimento popularmente difundido a respeito do teor proteico das folhas de ora-pro-nóbis tem fundamento científico (SILVA *et al.*, 2019; BOTREL *et al.*, 2020; BARREIRA *et al.*, 2020). Vale mencionar que tal quantidade de proteínas é bastante próxima àquela das folhas de *Moringa oleifera*, cujo valor médio é de aproximadamente 25,30% e um dos mais altos que se tem conhecimento até o presente momento (PEÑALVER *et al.*, 2022).

Os frutos também apresentaram níveis proteicos consideráveis e iguais ao averiguado anteriormente de 1% em base úmida (AGOSTINI-COSTA *et al.*, 2012). Uma vez que a ora-pro-nóbis é uma planta facilmente adaptável e difundida pelo território nacional, deveria ser mais cultivada e aproveitada em receitas ou produtos alimentícios para suprir parte das necessidades dietéticas dos brasileiros, visto que o consumo constante de proteínas de origem animal sobrecarrega o meio ambiente com práticas pecuaristas e prejudica a flora intestinal (RUST *et al.*, 2020; CAI *et al.*, 2021).

Análises sensoriais mostraram que houve boa aceitação do público em talharim e pães enriquecidos com ora-pro-nóbis (ROCHA *et al.*, 2008; MARTINEVISK, 2011). Nos produtos alimentícios, as proteínas são responsáveis por conferir propriedades sensoriais como textura, aparência, cor e sabor, sendo que ao interagir com outros grupos, como lipídeos e açúcares, modificam e valorizam suas propriedades funcionais (FENNEMA *et al.*, 2008). Outro fator importante para o processamento de alimentos é o teor de umidade, o qual pode afetar a qualidade do produto principalmente pelas alterações nutricionais e microbiológicas, resultando na proliferação de bactérias

responsáveis por degradar o alimento (BURTON; ENGELKIRK, 2003). Assim, a secagem das folhas e frutos foram realizadas até que a atividade de água (a_w) atingisse em torno de 0,4, valor que se encontra abaixo do limite estabelecido para o crescimento microbiano (LABUZA *et al.*, 1976; SCOTT, 1957). A TABELA 14 apresenta os resultados. Vale citar ainda que a secagem industrial de folhas e ervas é realizada em estufas com circulação de ar, e, portanto, as folhas neste trabalho foram secas igualmente (FOGAÇA *et al.*, 2021). A secagem dos frutos foi realizada por meio de liofilização para minimizar possíveis degradações, já que os frutos, ao contrário das folhas, ainda não são largamente comercializados e nem industrialmente processados, além de serem pouco estudados até o presente momento (MIRHOSSEINI *et al.*, 2013).

O teor de cinzas compreende os resíduos inorgânicos, como sais minerais que permanecem após a queima da matéria orgânica (FENNEMA *et al.*, 2008). O valor de 20,70% encontrado neste trabalho para as folhas se aproxima do relatado em estudos anteriores (GONÇALVES *et al.*, 2015; VARGAS *et al.*, 2017; BOTREL *et al.*, 2020). Através da análise de espectrofotometria de absorção atômica em chama descrita no item 4.1.1., foram determinados os teores de alguns dos minerais presentes nos frutos e folhas de ora-pro-nobis.

TABELA 14 - ATIVIDADE DE ÁGUA (a_w)

a_w	IN NATURA	SECOS
FOLHAS	0,974 ± 0,005	0,415 ± 0,004
FRUTOS	0,992 ± 0,000	0,412 ± 0,005

FONTE: O autor (2024).

4.1.1. Espectrofotometria de absorção atômica em chama

A TABELA 15 apresenta os resultados obtidos para os metais avaliados: alumínio, cálcio, cobalto, cromo, cobre, ferro, magnésio, manganês, níquel, chumbo, zinco, sódio, potássio e cádmio. Não foram detectados teores significativos de níquel, chumbo e cromo.

TABELA 15 - PERFIL MINERAL

MINERAL	FOLHAS SECAS (mg.100g ⁻¹)	FRUTOS SECOS (mg.100g ⁻¹)
Ca	52,50 ± 0,01	502,50 ± 0,00
Al	16,67 ± 0,04	13,88 ± 0,09
Co	0,65 ± 0,02	1,14 ± 0,05
Fe	5,59 ± 0,08	12,18 ± 0,02
Mg	261,87 ± 0,13	32,11 ± 0,10
Mn	6,67 ± 0,02	10,67 ± 0,01
Na	75,39 ± 0,36	74,72 ± 0,35
K	2250,61 ± 3,63	2727,11 ± 13,25
Cu	1,33 ± 0,00	1,35 ± 0,00
Zn	3,17 ± 0,04	3,42 ± 0,06
Cd	0,53 ± 0,02	0,68 ± 0,00

FONTE: O autor (2024).

É preocupante a presença de cádmio, um metal pesado, nos frutos e folhas de ora-pro-nobis de cultivo orgânico. A contaminação do solo e dos lençóis freáticos por cádmio pode acontecer de diversas formas e foi relatada em diversos países (CHELLAIAH, 2018). O cádmio é bastante biopersistente, ou seja, permanece residente nos organismos por anos após a contaminação, propagando efeitos tóxicos (WEGGLER *et al*, 2004). A infiltração de cádmio nas águas subterrâneas e no solo pode se dar através da indústria metalúrgica, tráfego, aterros sanitários, mineração, incidentes, emissões de combustão, baterias cádmio-níquel, revestimentos anticorrosivos, esterco de fazenda e lodo de esgoto (BIGALKE *et al*, 2017; WUANA; OKIEIMEN, 2011; ZHANG *et al*, 2009; BELON *et al*, 2012). Em adição, o uso de fertilizantes fosfatados sintéticos que contêm cádmio como impureza é causa comum para o aumento do teor do metal pesado no ambiente (KUBIER *et al.*, 2019). Foi proposto, inclusive, que tais fertilizantes fosfatados contendo cádmio, podem alterar a bioquímica do solo, modificando a população microbiana e contaminando a flora e a fauna (BIGALKE *et al.*, 2017; GRANT, 2011). Há algumas possibilidades para recuperação e limpeza do solo, como fitorremediação, biorremediação, adubagem orgânica e compostagem (LATA *et al*, 2019; PARTHIPAN *et al*, 2017; SOHAIL *et al*, 2019).

Observando os demais resultados e comparando com o exposto na TABELA 16, nota-se que o consumo de 100 gramas tanto de folhas secas quanto de frutos secos é capaz de suprir as necessidades diárias de cobre e manganês. O cobre é importante para a produção de células sanguíneas, colágeno, ossos e tecido conjuntivo, contribuindo ainda para a manutenção da saúde das células nervosas e do sistema imunológico. O manganês auxilia na formação dos tecidos conjuntivos, ossos, fatores de coagulação sanguínea e hormônios sexuais, além de participar do metabolismo de carboidratos, gorduras e na absorção de cálcio (SCHIEFERDECKER *et al*, 2015). 100 gramas dos frutos secos também são capazes de suprir a demanda de ferro do organismo feminino. Embora o teor de ferro das folhas secas de 5,58 mg.100g⁻¹ esteja abaixo do encontrado em outros estudos, como 31,97 mg.100g⁻¹ (RODRIGUES, 2016) e 11,72 mg.100g⁻¹ (BOTREL *et al*, 2020), o valor ainda supera o relatado para o espinafre de 1,11 mg.100g⁻¹ (LISIWESKA *et al*, 2009). O corpo humano contém ferro ligado à hemoglobina, mioglobina, citocromo, flavoproteínas, enzimas, ferritina, hemossiderina, lactoferrina e transferrina (TEIXEIRA, 2003; MAHAN, 2005; RAMOS, 2008).

Alguns dos valores encontrados para as folhas secas estão de acordo com o que foi verificado em outros estudos, como o teor de potássio de 2638 mg.100g⁻¹ e 2845,64 mg.100g⁻¹ (RODRIGUES, 2016; BOTREL *et al*, 2020). O potássio é um micronutriente imprescindível no que diz respeito ao metabolismo e à transmissão de impulsos eletroquímicos, existindo outras espécies vegetais que contam com teores de potássio próximos ao valor encontrado, como folhas secas de cenoura com 2744 mg.100g⁻¹ (LEHNINGER; COX, 2021; PEREIRA *et al*, 2003).

O teor de magnésio das folhas se encontra abaixo do esperado, visto que há relatos de folhas de ora-pró-nobis com 832,25 mg.100g⁻¹ e 2710 mg.100g⁻¹ (BOTREL *et al*, 2020; RODRIGUES, 2016). Entretanto, diversos vegetais apresentam teores mais próximos ao encontrado, como cenouras com 226 mg.100g⁻¹, couve com 292,2 mg.100g⁻¹, brócolis com 192,8 mg.100g⁻¹ e couve-flor com 154,4 mg.100g⁻¹ (PEREIRA *et al*, 2003; SANTOS *et al*, 2006). O magnésio é um mineral vinculado à produção de clorofila nas plantas e é fundamental para diversas reações no organismo humano, como a formação dos ossos e o funcionamento dos nervos e dos músculos (SCHIEFERDECKER *et al*,

2015). O valor medido de zinco de 3,17 mg.100g⁻¹ está próximo do teor de 2,47 mg.100g⁻¹ relatado para ora-pro-nobis cultivada no bioma do Cerrado brasileiro (BOTREL *et al*, 2020). O zinco é fundamental para ação de quase 100 enzimas, estando envolvido no crescimento celular, construção de proteínas, recuperação dos tecidos e contribuição para a saúde do sistema imunológico (ROOHANI *et al*, 2013).

TABELA 16 - CONSUMO DIÁRIO IDEAL DE MINERAIS CONFORME O GÊNERO E A IDADE

MINERAL	QUANTIDADE ADEQUADA PARA HOMENS	QUANTIDADE ADEQUADA PARA MULHERES	LIMITE SUPERIOR
Ca	31-50 anos: 1000 mg; + 51 anos: 1200 mg	31-50 anos: 1000 mg; + 51 anos: 1200 mg	2500 mg
Cu	900 µg	900 µg	10000 µg
Fe	31-50 anos: 18 mg; + 51 anos: 8 mg	31-50 anos: 8 mg; + 51 anos: 8 mg	45 mg
Mg	19-30 anos: 310 mg; 31-70 anos: 320 mg	19-30 anos: 400 mg; 31-70 anos: 420 mg	350 mg
Mn	1,8 mg	2,3 mg	11 mg
K	14-18 anos: 2300 mg; + 19 anos: 2600 mg	14-18 anos: 3000 mg; + 19 anos: 3400 mg	D
Na	1500 mg	1500 mg	D
Zn	8 mg	11 mg	40 mg

FONTE: Adaptado de <https://www.hsph.harvard.edu/nutritionsource/vitamins/>. Acesso em 08/01/24.

LEGENDA: D – desconhecido.

O cobalto é um elemento que pode existir nas formas inorgânica ou orgânica. A conformação orgânica o coloca como componente da vitamina B₁₂, desempenhando importante papel na produção de aminoácidos e proteínas do sistema nervoso (CZARNEK *et al*, 2015). De acordo com a Universidade de Rochester, o consumo diário de cobalto deve ser de 5 a 8 microgramas por dia, sendo que limites máximos ainda não foram estabelecidos. O teor encontrado de cobalto em 100 g das folhas e frutos secos supre além da demanda mencionada.

A maioria dos alimentos conta com teores variados de alumínio, em torno de 0,5 mg.100g⁻¹ até 89,9 mg.100g⁻¹ para folhas secas de chá preto (MULLER *et al*, 1998). Vale citar que o alumínio não é necessário em sistemas biológicos e nem é elucidado como participante de reações em organismos vivos. Embora todos os seres contenham certa quantidade de alumínio, não existe evidência científica de propósitos desempenhados por ele (EXLEY, 2013).

É perceptível que os valores encontrados para cálcio divergem bastante daqueles verificados em outras pesquisas, a expor 3190 mg.100g⁻¹, 3400 mg.100g⁻¹, 3420 mg.100g⁻¹, 3800 mg.100g⁻¹ e 3800 mg.100g⁻¹ (ALMEIDA FILHO; CAMBRAIA, 1974; DAYRELL, 1977; TAKEITI *et al.*, 2009; RODRIGUES, 2016). A variação no teor de micronutrientes se justifica, principalmente, pela influência dos fatores relacionados ao cultivo do solo, como pH e o emprego de fertilizantes (KHADER; RAMA, 2003; UUSIKU *et al*, 2010; ROHANI-GHADIKOLAEI *et al*, 2012).

4.2 AVALIAÇÃO DOS PARÂMETROS DE EXTRAÇÃO

4.2.1. Seleção do solvente

A seleção do melhor solvente para a extração dos frutos e folhas foi realizada a partir das análises de CFT, FT e DPPH com base na variação térmica (25°C, 45°C e 65°C) e de tempo (5', 10' e 15'). Foram mantidas constantes a proporção (m.v⁻¹) de 1:20 e a rotação de 5000 rpm. Os solventes pré-selecionados foram etanol e solução hidroalcolica. Os resultados das análises CFT, FT, DPPH dos extratos das folhas e frutos estão apresentados nas TABELAS 17 e 18, respectivamente. O obtido para AT está na TABELA 19.

Observando os resultados, é perceptível que os valores mais expressivos se apresentam para as extrações realizadas com a solução etanólica 70% e não com o solvente puro. Tal comportamento já era esperado, uma vez que misturas de solventes têm maior probabilidade de afinidade molecular com a variedade de substâncias a serem extraídas da matriz em comparação ao solvente puro (DO *et al*, 2014). Logo, as demais análises foram realizadas partindo dos extratos hidroalcolicos. É notável também que as folhas apresentam maior teor de compostos bioativos, o que está de acordo com o verificado por Batista e

colaboradores (2017) em estudo de comparação entre as folhas e os frutos de *Syzygium malaccense* (jambo vermelho).

TABELA 17 - RESULTADOS DE CONTEÚDO DE CFT E FT, E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VIA DPPH DOS EXTRATOS DAS FOLHAS SECAS DE ORA-PRO-NÓBIS OBTIDOS A PARTIR DE ESL ASSISTIDA POR DISPERSOR DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DO SOLVENTE, TEMPERATURA E TEMPO NO PROCESSO

EXT. FOLHAS	25°C			45°C			65°C		
	CFT ^x	FT ^y	DPPH ^z	CFT ^x	FT ^y	DPPH ^z	CFT ^x	FT ^y	DPPH ^z
5' EtOH/H ₂ O	26,797 ± 0,498 ^g	34,601 ± 1,087 ^g	0,201 ± 0,002 ^f	37,788 ± 0,812 ^{d,e}	38,691 ± 0,606 ^f	0,210 ± 0,002 ^e	38,909 ± 1,259 ^{c,d}	48,212 ± 0,471 ^b	0,219 ± 0,003 ^d
10' EtOH/H ₂ O	30,210 ± 0,308 ^f	39,416 ± 0,554 ^{e,f}	0,216 ± 0,001 ^d	37,942 ± 0,642 ^{c,b}	43,256 ± 0,139 ^d	0,224 ± 0,002 ^b	44,097 ± 0,355^a	55,076 ± 0,368^a	0,235 ± 0,002^a
15' EtOH/H ₂ O	36,194 ± 0,926 ^e	39,739 ± 0,274 ^e	0,217 ± 0,001 ^d	38,136 ± 0,413 ^{d,e}	44,543 ± 0,361 ^c	0,223 ± 0,001 ^{c,b}	42,303 ± 0,771 ^{a,b}	44,937 ± 0,136 ^c	0,228 ± 0,001 ^a
5' EtOH	21,536 ± 0,737 ^e	26,167 ± 0,630 ^f	0,174 ± 0,002 ^e	30,602 ± 1,321 ^d	29,454 ± 0,606 ^e	0,184 ± 0,001 ^f	31,811 ± 1,620 ^{b,c,d}	37,684 ± 0,627 ^c	0,195 ± 0,004 ^{d,c}
10' EtOH	24,296 ± 0,349 ^e	34,856 ± 1,322 ^d	0,191 ± 0,002 ^d	30,794 ± 0,97 ^{a,b,c}	38,376 ± 0,865 ^{b,c}	0,199 ± 0,001 ^b	35,865 ± 1,019 ^a	49,213 ± 0,736 ^a	0,210 ± 0,003 ^a
15' EtOH	29,288 ± 1,174 ^d	35,075 ± 0,597 ^d	0,192 ± 0,001 ^d	30,892 ± 0,401 ^{c,d}	39,583 ± 0,759 ^{b,c}	0,198 ± 0,002 ^{b,c}	34,398 ± 1,376 ^{a,b}	39,976 ± 0,894 ^b	0,204 ± 0,001 ^a

FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: ^x CFT (mg de ácido gálico. g de amostra⁻¹)

^y FT (mg de catequina. g de amostra⁻¹)

^z DPPH (mmol de trolox. g de amostra⁻¹)

^a Valores obtidos por meio de ANOVA *one-way*. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

TABELA 18 - RESULTADOS DE CONTEÚDO DE CFT E FT, E ATIVIDADE ANTIOXIDANTE VIA DPPH DOS EXTRATOS DOS FRUTOS SECOS DE ORA-PRO-NÓBIS OBTIDOS A PARTIR DE ESL ASSISTIDA POR DISPERSOR DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DO SOLVENTE, TEMPERATURA E TEMPO NO PROCESSO

EXT. FRUTOS	25°C			45°C			65°C		
	CFT ^x	FT ^y	DPPH ^z	CFT ^x	FT ^y	DPPH ^z	CFT ^x	FT ^y	DPPH ^z
5' EtOH/H ₂ O	5,709 ± 0,253 ^f	2,028 ± 0,080 ^d	0,134 ± 0,003 ^f	7,114 ± 0,366 ^e	2,173 ± 0,107 ^d	0,145 ± 0,002 ^e	11,622 ± 0,152 ^b	2,433 ± 0,060 ^b	0,138 ± 0,003 ^{e,f}
10' EtOH/H ₂ O	6,917 ± 0,255 ^e	2,754 ± 0,024 ^b	0,154 ± 0,002 ^d	8,234 ± 0,266 ^d	2,891 ± 0,023 ^b	0,164 ± 0,001 ^{b,c}	13,368 ± 0,252^a	3,224 ± 0,023^a	0,172 ± 0,002^b
15' EtOH/H ₂ O	7,724 ± 0,102 ^{e,d}	2,792 ± 0,084 ^b	0,158 ± 0,002 ^{c,d}	9,192 ± 0,099 ^c	2,833 ± 0,023 ^b	0,157 ± 0,002 ^c	13,285 ± 0,583 ^a	3,194 ± 0,023 ^a	0,170 ± 0,002 ^{a,b}
5' EtOH	3,888 ± 0,318 ^e	1,408 ± 0,118 ^e	0,083 ± 0,002 ^f	4,987 ± 0,406 ^{d,e}	1,523 ± 0,122 ^{e,d}	0,089 ± 0,003 ^{e,f}	8,905 ± 0,324 ^b	1,809 ± 0,101 ^d	0,092 ± 0,002 ^e
10' EtOH	4,858 ± 0,365 ^{d,e}	2,312 ± 0,084 ^c	0,100 ± 0,001 ^d	5,958 ± 0,418 ^{c,d}	2,426 ± 0,105 ^{b,c}	0,108 ± 0,001 ^{b,c}	10,268 ± 0,416 ^a	2,734 ± 0,079 ^a	0,115 ± 0,002 ^a
15' EtOH	5,556 ± 0,310 ^d	2,335 ± 0,107 ^c	0,103 ± 0,002 ^{c,d}	6,787 ± 0,151 ^c	2,375 ± 0,091 ^{b,c}	0,103 ± 0,001 ^c	10,177 ± 0,796 ^{a,b}	2,706 ± 0,062 ^{a,b}	0,113 ± 0,001 ^{a,b}

FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: ^x CFT (mg de ácido gálico. g de amostra⁻¹)

^y FT (mg de catequina. g de amostra⁻¹)

^z DPPH (mmol de trolox. g de amostra⁻¹)

^a Valores obtidos por meio de ANOVA *one-way*. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

TABELA 19 - RESULTADOS DE CONTEÚDO DE AT DOS EXTRATOS SECOS DE ORA-PRO-NÓBIS OBTIDOS A PARTIR DE ESL ASSISTIDA POR DISPERSOS DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO NO PROCESSO

EXTRATO	25°C			45°C			65°C		
	5'	10'	15'	5'	10'	15'	5'	10'	15'
FL EtOH/H ₂ O	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FR EtOH/H ₂ O	0,070 ± 0,009 ^d	0,074 ± 0,011 ^{c,d}	0,074 ± 0,011 ^{c,d}	0,132 ± 0,099 ^b	0,170 ± 0,011 ^a	0,101 ± 0,000 ^{b,c}	0,036 ± 0,001 ^f	0,038 ± 0,000 ^{e,f}	0,033 ± 0,000 ^f
FL EtOH	---	---	---	---	---	---	---	---	---
FR EtOH	0,061 ± 0,007 ^c	0,066 ± 0,008 ^c	0,067 ± 0,007 ^c	0,116 ± 0,063 ^b	0,153 ± 0,007 ^a	0,091 ± 0,000 ^b	0,033 ± 0,000 ^d	0,034 ± 0,000 ^d	0,029 ± 0,000 ^d

FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: ^x AT (mg de cianidina-3-glicosídeo. g de amostra⁻¹)

^a Valores obtidos por meio de ANOVA *one-way*. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

4.2.2. Seleção do tempo e da temperatura

Conforme os resultados apresentados nas TABELAS 17 e 18, o tempo de extração se mostrou mais eficaz no período intermediário de 10 minutos, o que é condizente com o método de ESL assistida por dispersor de alto cisalhamento, uma vez que tal processo é capaz de acelerar a transferência de massa (XU et al, 2016). A alta eficiência de extração em curto período através do método empregado pode ser explicada pelo número de Sherwood (Sh), cujo significado está apresentado na EQUAÇÃO 3.

$$Sh(Re, Sc) = a Re^{\alpha} Sc^{\beta} \quad (3)$$

O número de Sherwood está diretamente relacionado à transferência de massa (BASILE et al, 2024). Sh é função dos números adimensionais de Reynolds (Re) e de Schmidt (Sc). Vale citar que há diferentes adaptações da EQUAÇÃO 3 conforme a geometria da superfície e a hidrodinâmica do sistema, a qual pode ter regime laminar ou turbulento (CARTA, 2021). Sabe-se que a turbulência do meio é proporcional ao número de Reynolds, ou seja, neste caso, maior turbulência contribuirá para maior taxa de transferência de massa (CARTA, 2021). Logo, a turbulência instaurada no sistema pelo dispersor Ultraturrax é benéfica para a extração dos compostos de interesse. Avaliação similar pode ser feita em relação ao aumento de temperatura, o qual, além de contribuir para a agitação molecular como um todo, é responsável por diminuir a viscosidade do meio líquido que circunda as partículas sólidas (KORETZKY, 2012). A viscosidade também está vinculada tanto ao número de Reynolds quanto ao número de Schmidt, sendo tal propriedade relacionada de maneira inversa à taxa de transferência de massa, ou seja, quanto menor a viscosidade do meio, maior a taxa de transferência de massa (CARTA, 2021). Por esse motivo, os resultados apresentados anteriormente são mais satisfatórios com o aumento da temperatura. É importante comentar que para substâncias termolábeis, o aumento excessivo da temperatura ou a exposição prolongada podem levar à termodegradação (HSIEH et al, 2020). Tal fato pode ser observado em muitos dos resultados referentes à exposição prolongada de 15

minutos sob temperaturas mais altas com a diminuição do teor de fenólicos, flavonoides e da atividade antioxidante como um todo. Fica ainda mais evidente quando se avalia o obtido para AT na TABELA 19, que, embora o teor seja baixo nos frutos e indetectável nas folhas, o efeito da degradação térmica chega a aproximadamente 80% no caso mais crítico. As antocianinas são bastante suscetíveis a fatores de processamento, como pH e temperatura (AMIT et al, 2020).

Os resultados obtidos para o ensaio TBARS estão expostos na TABELA 20 e expressos como índice de inibição (%) da oxidação lipídica da gema do ovo. É notável que os números apresentam comportamento similar ao exposto nas TABELAS 17 e 18, com as melhores performances correspondentes ao tempo de 10 minutos e 65°C. O teste de inibição da oxidação lipídica se torna relevante por conta do processo de formação de ALEs, do inglês advanced lipoxidation end products ou produtos de lipoxidação avançada, que são nocivos à saúde conforme mencionado no item 2 deste trabalho (VISTOLI et al, 2013). Os resultados do ensaio TBARS demonstram a capacidade dos extratos de ora-pro-nóbis de inibir a formação de aldeído malônico e outros compostos precursores dos ALEs (LV et al, 2014; JOVÉ et al, 2020).

Apesar de os extratos das folhas conterem muito mais compostos bioativos e maior representatividade na análise DPPH, a atividade anti-lipoxidação dos extratos dos frutos apresentou boa performance. Esse tipo de situação já foi relatado antes para polissacarídeos extraídos da planta medicinal chinesa *Polygonum multiflorum*, os quais apresentaram maior capacidade de inibição da oxidação de lipídeos via TBARS do que nos testes de oxidação por peróxido de hidrogênio, radical hidroxil e ânion superóxido (LV et al, 2014). Vale citar ainda que os métodos DPPH e ABTS não são adequados para verificar a atividade antioxidante de polissacarídeos (FERNANDES; COIMBRA, 2023).

O fato de que há maior concentração de sacarídeos e outros carboidratos nos extratos dos frutos se reflete no rendimento das extrações (TABELA 21). O rendimento obtido para as extrações dos frutos foi por volta de 50%, enquanto para as folhas foi em torno de 13%. O estudo realizado por Carvalho e colaboradores (2014) mostrou que o rendimento das extrações das folhas de ora-pro-nóbis, com solução etanólica 95%, foi de aproximadamente 11%, o que é muito similar ao verificado neste trabalho.

Os resultados da análise TBARS sugerem que a temperatura de 65°C e os tempos de 10 e 15 minutos são ideais para as extrações, principalmente no caso dos frutos cujos valores são idênticos. Portanto, as análises antiglicante e antimicrobiana foram realizadas para os extratos das folhas e frutos obtidos a partir dessas condições, totalizando quatro amostras.

TABELA 20 - RESULTADOS DE INIBIÇÃO DO PROCESSO DE OXIDAÇÃO LIPÍDICA DA GEMA DO OVO VIA TBARS COM EXTRATOS DE ORA-PRO-NÓBIS OBTIDOS A PARTIR DE ESL ASSISTIDA POR DISPERSOR DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO NO PROCESSO

EXTRATO	25°C			45°C			65°C		
	<i>I (%)</i> ^x 5'	<i>I (%)</i> ^x 10'	<i>I (%)</i> ^x 15'	<i>I (%)</i> ^x 5'	<i>I (%)</i> ^x 10'	<i>I (%)</i> ^x 15'	<i>I (%)</i> ^x 5'	<i>I (%)</i> ^x 10'	<i>I (%)</i> ^x 15'
FOLHAS	44,72 ± 0,60 ^g	47,86 ± 0,47 ^f	52,45 ± 0,26 ^c	51,83 ± 0,40 ^c	54,57 ± 0,13 ^e	55,76 ± 0,13 ^b	56,16 ± 0,48 ^{a,b}	58,68 ± 0,13^d	56,82 ± 0,13^a
FRUTOS	38,54 ± 0,61 ^e	41,59 ± 0,13 ^d	42,83 ± 0,20 ^{c,d}	44,50 ± 1,26 ^c	47,68 ± 0,40 ^{a,b}	49,05 ± 0,43 ^b	48,61 ± 0,79 ^d	50,55 ± 0,43^a	50,55 ± 0,43^a

FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: ^x Índice de inibição das espécies produzidas pela oxidação dos lipídeos da gema do ovo, cujo representante mais conhecido é o (di)aldeído malônico

^a Valores obtidos por meio de ANOVA *one-way*. Letras diferentes na mesma coluna representam diferença significativa entre as amostras por meio do teste de Tukey com $p \leq 0,05$.

TABELA 21 - RESULTADOS DE RENDIMENTO DA ESL ASSISTIDA POR DISPERSOR DE ALTO CISALHAMENTO, TENDO COMO BASE A INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA E DO TEMPO NO PROCESSO

EXTRATO	25°C			45°C			65°C		
	<i>R (%)</i> ^x 5'	<i>R (%)</i> ^x 10'	<i>R (%)</i> ^x 15'	<i>R (%)</i> ^x 5'	<i>R (%)</i> ^x 10'	<i>R (%)</i> ^x 15'	<i>R (%)</i> ^x 5'	<i>R (%)</i> ^x 10'	<i>R (%)</i> ^x 15'
FOLHAS	9,10	9,99	10,48	11,18	11,21	11,51	11,83	12,61	12,48
FRUTOS	42,60	46,78	52,37	45,84	47,19	52,97	44,37	49,37	54,22

FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: ^x Rendimento das extrações hidroalcoólicas com base na massa de extrato seco em relação à massa de amostra seca, sendo a amostra seca 10 gramas de folhas em pó ou 10 gramas de frutos em pó.

4.2.3. Atividade antiglicante

O comportamento da atividade anti-lipoxidação se repete quando os resultados da atividade antiglicante via MALDI-TOF (FIGURAS 14 e 15) são analisados, os quais apontam melhor performance para os extratos das folhas. A TABELA 22 apresenta o número de adutos de açúcar ligados à proteína (N), e os índices de inibição de número de adutos de açúcar ligados à proteína em relação à proteína glicada. Os valores de N obtidos para BSA glicada e BSA glicada com interferência de DMSO foram de 0,73 e 0,79, respectivamente, denotando que a presença do solvente favoreceu a glicação. Após o padrão de ácido rosmarínico, o melhor desempenho se relaciona ao tempo de 10' para ambas as matrizes vegetais, embora a diferença entre elas seja muito sutil. Vale citar que o trabalho realizado por Maciel e colaboradores (2023) apresentou resultados positivos para a atividade antiglicante das folhas de ora-pro-nóbis, com inibição de 57,03% dos AGEs fluorescentes para o extrato fracionado por hexano na concentração de 1,50 mg. mL⁻¹.

TABELA 22 - COMPARATIVO DE INIBIÇÃO DA GLICAÇÃO

AMOSTRA	ESPECTRO	N	I (%)
65°C 10' ^a	66724,769	0,51	35,19
65°C 15' ^a	66725,479	0,51	34,69
65°C 10' ^b	66705,537	0,40	48,78
65°C 15' ^b	66708,763	0,42	46,50
PADRÃO	66667,617	0,19	75,58

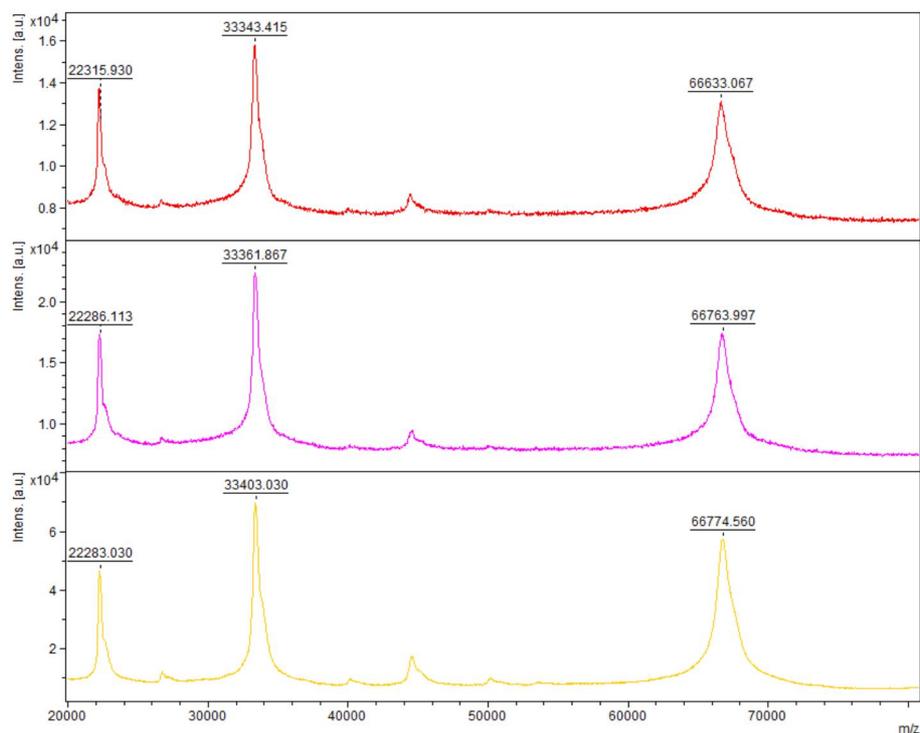
FONTE: O autor (2024).

LEGENDA: ^a Extratos dos frutos.

^b Extratos das folhas.

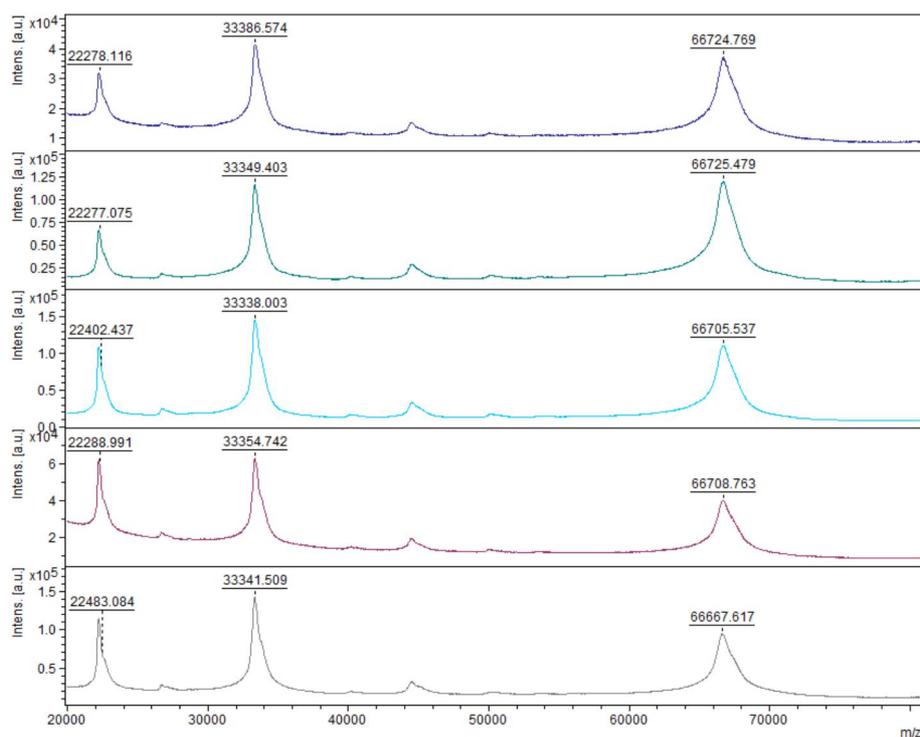
Os resultados da análise de PAGE (FIGURA 16) estão condizentes com o verificado via MALDI-TOF, uma vez que apresenta inibição da glicação através do menor deslocamento da banda, ou seja, quanto mais glicada está a proteína, maior é o deslocamento (as setas apontam a diferença entre as bandas, porém o deslocamento se dá no sentido oposto, ou para baixo).

FIGURA 14 - ESPECTRO DE MASSA MALDI-TOF PARA: (VERMELHO) BSA, (ROSA) BSA GLICADA COM FRUTOSE E (AMARELO) BSA GLICADA COM FRUTOSE NA PRESENÇA DE DMSO



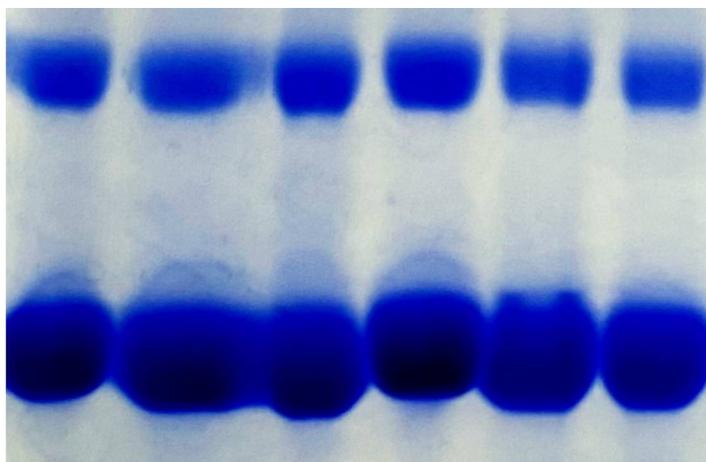
FONTE: O autor (2024).

FIGURA 15 - ESPECTRO DE MASSA MALDI-TOF PARA BSA GLICADA COM FRUTOSE NA PRESENÇA DE: (AZUL ESCURO) EXTRATO DOS FRUTOS 65°C/10', (VERDE) EXTRATO DOS FRUTOS 65°C/15', (AZUL CLARO) EXTRATO DAS FOLHAS 65°C/10', (VINHO) EXTRATO DAS FOLHAS 65°C/15', (CINZA) ÁCIDO ROSMARÍNICO



FONTE: O autor (2024).

FIGURA 16 - RESULTADO PAGE. DA ESQUERDA PARA A DIREITA: BSA NATIVA, BSA GLICADA, BSA GLICADA COM A INTERFERÊNCIA DE DMSO, BSA GLICADA COM A INTERFERÊNCIA DE ÁCIDO ROSMARÍNICO, BSA GLICADA COM A INTERFERÊNCIA DE EXTRATO DO FRUTO A 65°C/10' E BSA GLICADA COM A INTERFERÊNCIA DE EXTRATO DA FOLHA A 65°C/10'



FONTE: O autor (2024).

Lv e colaboradores (2014) verificaram que os polissacarídeos de *Polygonum multiflorum* exibem capacidade de suprimir a formação de AGEs fluorescentes. O estudo conduzido por Vasarri e colaboradores (2020) utilizou extrato hidroalcolólico 70% da planta marinha *Posidonia oceanica* para inibir a glicação em modelo *in vitro* e chegou à conclusão de que a atividade antiglicante não pode ser atribuída exclusivamente à atividade antioxidante.

Sabe-se que os compostos bioativos desempenham importante papel ao neutralizar radicais livres, além da capacidade de aprisionamento de espécies reativas como metilglicoxal (YEH *et al*, 2016). Já os polissacarídeos aniônicos, como os pécnicos e os alginatos, têm atividade antioxidante relacionada à capacidade quelante de íons metálicos e à possível formação de complexos de coordenação com tais íons, os quais permitem a eliminação direta do OH• gerado adjacientemente à estrutura do polissacarídeo (PRISTOV *et al*, 2011).

O estudo de otimização da extração da mucilagem de folhas de ora-pro-nóbis conduzido por Junior e colaboradores (2013) menciona que proteínas conjugadas a polissacarídeos dão origem às suas propriedades emulsificantes. É sugerido ainda que ora-pro-nóbis é heteropolimolecular, ou seja, as moléculas de açúcares presentes na mucilagem diferem em termos de composição, modo de ligação e massa molecular, além de conter alto teor proteico e, conseqüentemente, boa capacidade de formação e estabilização de emulsões.

Em sistemas emulsionados, sabe-se que os emulsificantes proteicos reagem com os radicais livres formados através da oxidação lipídica, agindo como antioxidantes (SCHAICH, 2008; HEMATYAR *et al.*, 2019; BERTON *et al.*, 2012). Zhang e colaboradores (2022) sugerem um mecanismo pelo qual os oligossacarídeos extraídos da quitosana inibem a peroxidação lipídica: competição baseada na captura de aminoácidos de radicais livres, uma vez que os sacarídeos da quitosana, assim como os sacarídeos do OPN, contêm grupos amino em sua estrutura (JUNIOR *et al.*, 2013). De acordo com Sierakowski e colaboradores (1990), os complexos polissacarídeos de ora-pro-nóbis são ramificados, contendo unidades de arabinofuranose, arabinopirranose, galactopirranose, galactopiranosil, ácido urônico e ramnopirranose. Foi relatado também que compostos fenólicos oxidados ligados covalentemente a polissacarídeos são abundantemente encontrados em bagaços de frutas (FERNANDES *et al.*, 2019). Tais compostos fenólicos oxidados podem reagir com aminoácidos, sugerindo que, além da estrutura do açúcar, as porções protéicas de arabinogalactanas poderiam ser substituídas por compostos fenólicos oxidados (FERNANDES; COIMBRA, 2023). Uma hipótese é que tanto os sacarídeos ligados a polifenóis quanto os não-ligados poderiam interferir nas reações de glicação de maneira a minimizar a formação de AGEs.

Existe ainda o mecanismo de adsorção de polifenóis em polissacarídeos (FERNANDES; COIMBRA, 2023), o qual poderia também interferir nas reações. Embora energeticamente mais fraca do que as interações covalentes, a ocorrência de múltiplos sítos de ligação ao longo da estrutura dos polissacarídeos resulta na formação de complexos carboidrato/polifenol altamente estáveis cuja dissociação é pouco provável através de técnicas convencionais de purificação de polissacarídeos, como diálise ou até mesmo precipitação por etanol (GONÇALVES *et al.*, 2018).

Foi publicado pela AOAC que fibras solúveis de cadeia curta, as quais são solúveis em soluções etanólicas, devem ser quantificadas por cromatografia de permeação em gel e não pelo modelo clássico de precipitação em álcool, principalmente moléculas com grau de polimerização (DP) menor do que 12 (YAN, 2017). Sabe-se que a pectina, uma família de polissacarídeos aniônicos, ocorre em misturas quando extraída de matérias-primas em solução aquosa. A precipitação por álcool é um método eficiente comumente usado para a

precipitação da pectina, mas nem todas as substâncias pécticas podem ser precipitadas, mesmo que seja usada proporção de volume de álcool puro para extrato de 3:1 (GUO *et al.*, 2016).

De acordo com Balto e colaboradores (2016), a extração de polissacarídeos com soluções etanólicas pode ser utilizada para estreitar a faixa de DP de produtos de hidrólise de amido, uma vez que polissacarídeos de menor massa molecular permanecem em solução. Os polissacarídeos que acabam por precipitar durante a interação com o etanol podem aprisionar, ou encapsular, polifenóis (MUNIN; EDWARDS-LÉVY, 2011), e acabar por reduzir o teor de tais componentes no sobrenadante. Entretanto, é muito importante ressaltar que o estudo realizado por Wang e colaboradores (2011) aponta que a atividade antiglicante de polissacarídeos extraídos da abóbora aumenta com a redução da massa molecular dos polissacarídeos. Ou seja, a provável alta concentração de sacarídeos de baixa massa molecular nos extratos dos frutos pode ter relação com sua performance. De forma análoga, o teor bastante reduzido de polifenóis verificado nos extratos dos frutos pelos ensaios de CFT, FT e HPLC-DAD pode ter contribuição do efeito de aprisionamento de bioativos pelos polissacarídeos de maior massa molecular em virtude da incompatibilidade com a solução hidroetanólica 70%.

Já para os extratos das folhas, o desempenho aparenta ter relação, porém não exclusivamente, com o elevado teor de polifenóis. Polifenóis vegetais, como resveratrol, ácido ferúlico, ácido gálico, epigallocatequina e galato de epigallocatequina (EGCG), bem como uma série de outros compostos de ácidos fenólicos e classes de flavonoides e seus glicosídeos com monossacarídeos naturais, demonstraram ser eficazes na proteção contra a glicação (ELOSTA *et al.*, 2012; SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2014; SADOWSKA-BARTOSZ *et al.*, 2015). Os extratos das folhas também contêm sacarídeos, os quais, analogamente aos frutos, contribuem para as atividades biológicas.

4.2.4. Atividade antimicrobiana

Não foi verificada atividade antimicrobiana significativa para os extratos em nenhuma das cepas testadas. Esse fato está de acordo com o verificado por outros autores, como Rodrigues (2016) e Lopes e colaboradores (2022).

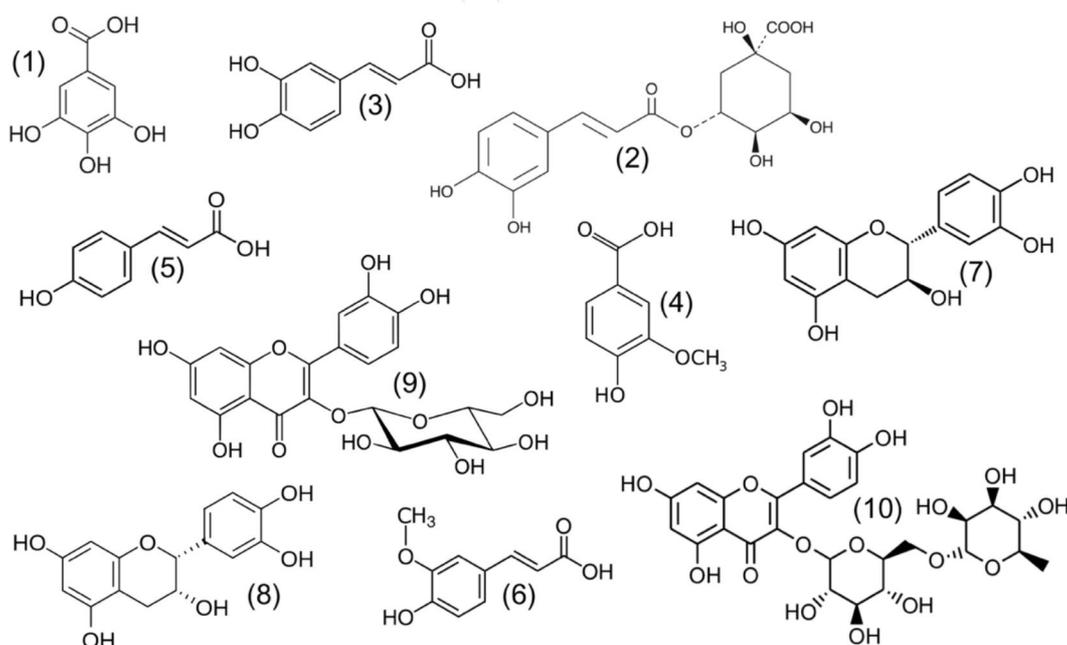
Entretanto, o estudo de Garcia e colaboradores (2019) verificou atividade antimicrobiana sutil para os extratos hidroetanólicos das folhas de ora-pro-nóbis.

É possível inferir que poderia ter sido observada alguma atividade se o solvente utilizado para ressuspensão dos extratos fosse outro, uma vez que o dimetil-sulfóxido pode ter efeito protetivo sobre as colônias bacterianas em ensaios de curta duração (HONGFEI et al, 2016), e, neste caso, sendo realizados testes em extratos de pouca efetividade, o efeito protetivo do dimetil-sulfóxido pode ter sido suficiente para sobrepor possível atividade antimicrobiana da planta.

4.2.5. Cromatografia em fase líquida

Conforme sugerido pelos testes de CFT e FT, foi verificado maior teor dos componentes avaliados nos extratos das folhas. A TABELA 23 apresenta os resultados. A FIGURA 17 mostra as estruturas dos compostos identificados e os cromatogramas se encontram nos ANEXOS 1 e 2.

FIGURA 17 - ESTRUTURAS IDENTIFICADAS NA CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA. (1) ÁCIDO GÁLICO; (2) ÁCIDO CLOROGÊNICO; (3) ÁCIDO CAFEICO; (4) ÁCIDO VANÍLICO; (5) ÁCIDO CUMÁRICO; (6) ÁCIDO FERÚLICO; (7) CATEQUINA; (8) PROCIANIDINA; (9) RUTINA; (10) ISOQUERCETINA



FONTE: O autor (2024).

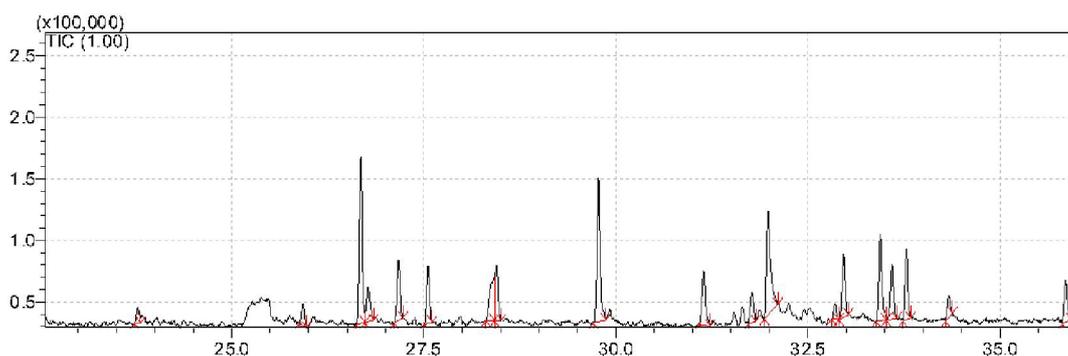
Foi demonstrado por estudos anteriores que os ácidos gálico, vanílico, clorogênico e ferúlico podem inibir significativamente alterações proteicas mediadas por açúcares, e, em especial os ácidos clorogênico, ferúlico e vanílico, são capazes de suprimir a produção de AGEs e consequente reticulação das proteínas (WU *et al*, 2010). É discutido ainda que a capacidade de aprisionar o MG está relacionada ao número de hidroxilas dos anéis aromáticos, sendo sugerido que moléculas com três ou mais hidroxilas tem melhor performance (LO *et al*, 2011). A posição da carbonila também aparenta ter influência.

De acordo com Wu e Yen (2005), a rutina e outras flavonas, são os flavonoides com maior capacidade antiglicante, tendo atuação em mais de uma etapa da reação de Maillard.

4.2.6. Cromatografia em fase gasosa

A cromatografia em fase gasosa para o extrato das folhas (ANEXO 4) foi capaz de detectar mais compostos de interesse, uma vez que a aparente incompatibilidade do extrato dos frutos com os solventes testados (acetato de etila, hexano e diclorometano) inviabilizou a visualização de mais substâncias além de alguns poucos ésteres de ácidos graxos (ANEXO 3), como metil oleato.

FIGURA 18 – RESULTADOS GC-MS COM ENFOQUE NOS TERPENOS



FONTE: O autor (2024).

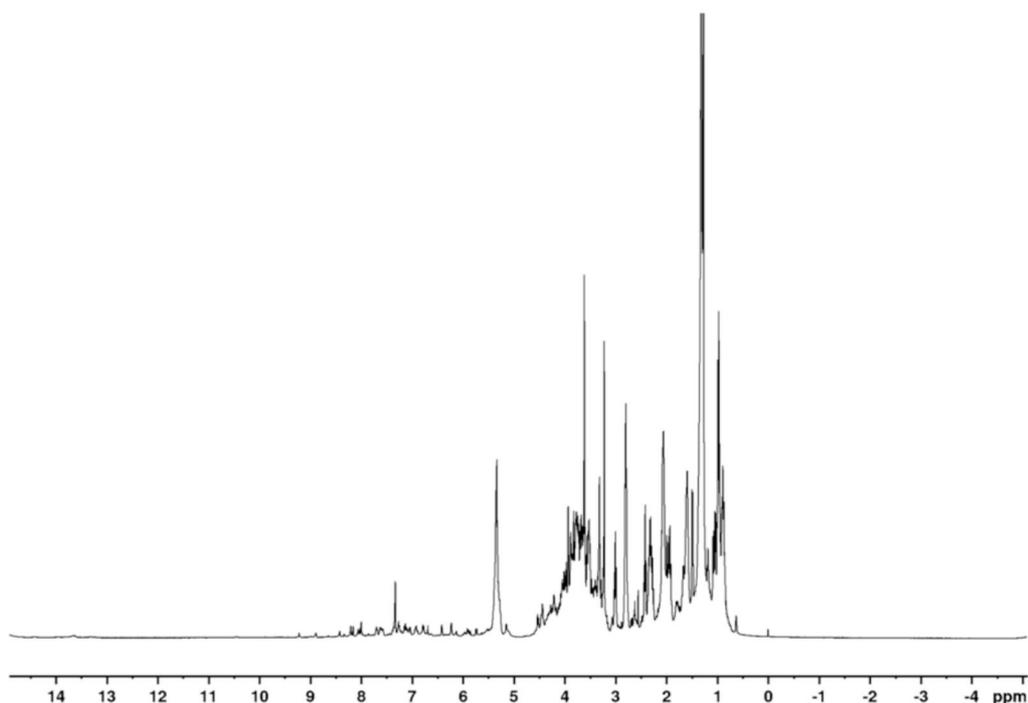
A FIGURA 18 apresenta parte do cromatograma do ANEXO 4, no qual se chama a atenção para duas substâncias detectadas: neofitadieno (tempo de retenção 26,681 minutos) e fitol (tempo de retenção de 31,982 minutos) nas concentrações de 10,24% e 3,84% das frações voláteis, respectivamente.

Ambos os compostos foram detectados em trabalhos anteriores, conforme mencionado por Maciel e colaboradores (2023). O neofitadieno é um diterpeno com ação ansiolítica e anticonvulsante (GONZALEZ-RIVERA *et al*, 2023), sendo considerado um composto benéfico para ação farmacológica e terapêutica. O fitol também é classificado como terpeno e tem ação antioxidante, antinociceptiva, antiinflamatória, imunomoduladora, antimicrobiana e antipirética (ISLAM *et al*, 2018).

4.2.7. Ressonância magnética nuclear para sólidos

Os extratos apresentaram sinais em diversas regiões espectrais no RMN de HR-MAS de ^1H . As FIGURAS 19 e 20 expõe o espectro das folhas e dos frutos, respectivamente.

FIGURA 19 - RMN DE HR-MAS PARA EXTRATO DAS FOLHAS

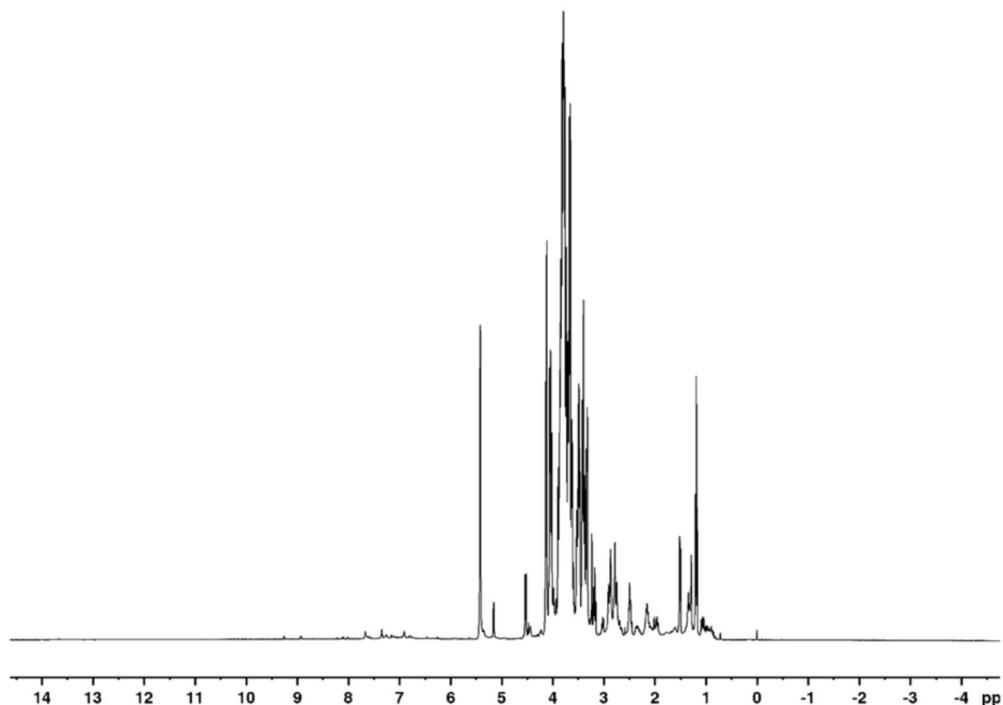


FONTE: O autor (2024).

É notável que em ambos os espectros, a região dos carboidratos (entre 3 e 6 ppm) contém diversos picos de detecção, denotando a presença dessas moléculas (BUBB, 2006). Ao aproximar as imagens (FIGURA 21) percebe-se alguns picos semelhantes àqueles referentes a sacarídeos, como sacarose e

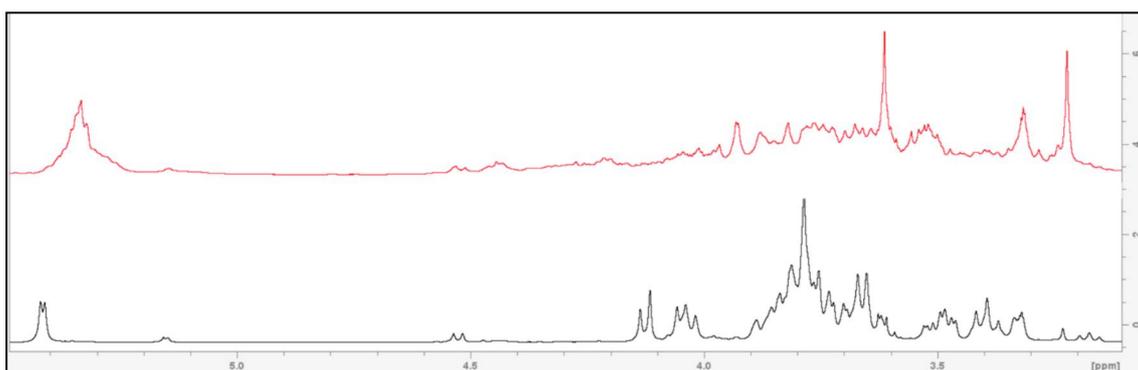
glicose, e ainda alguns detectados na mucilagem de ora-pro-nóbis por Martin e colaboradores (2017), como arabinose, ramnose e galactose, em especial para o extrato das folhas (vermelho).

FIGURA 20 - RMN DE HR-MAS PARA EXTRATO DOS FRUTOS



FONTE: O autor (2024).

FIGURA 21 - ESPECTROS H RMN DA REGIÃO CARACTERÍSTICA DE CARBOIDRATOS

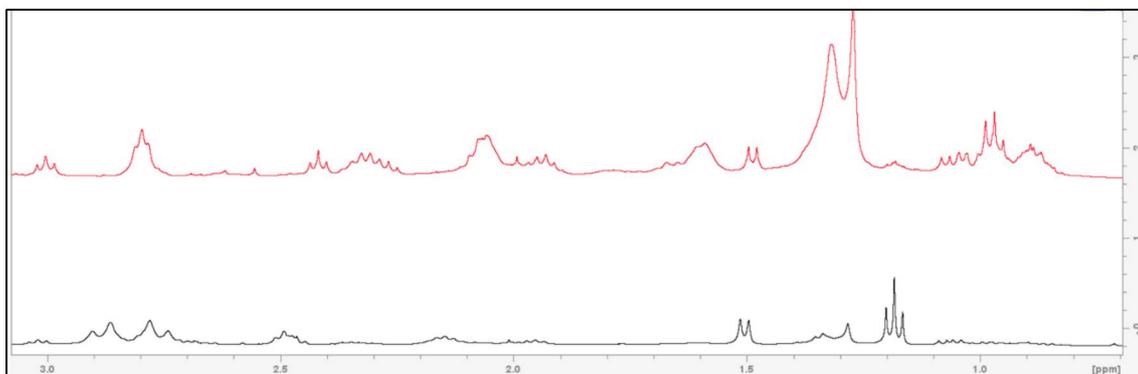


FONTE: O autor (2024).

Nas regiões de menor deslocamento químico se encontram principalmente aminoácidos e terpenos, como o neofitadieno e o fitol identificados nas folhas de ora-pro-nóbis via GC-MS. Mais uma vez é perceptível

a diferença entre os extratos, visto que as folhas (vermelho) são mais ricas tanto em bioativos quanto em proteínas (FIGURA 22).

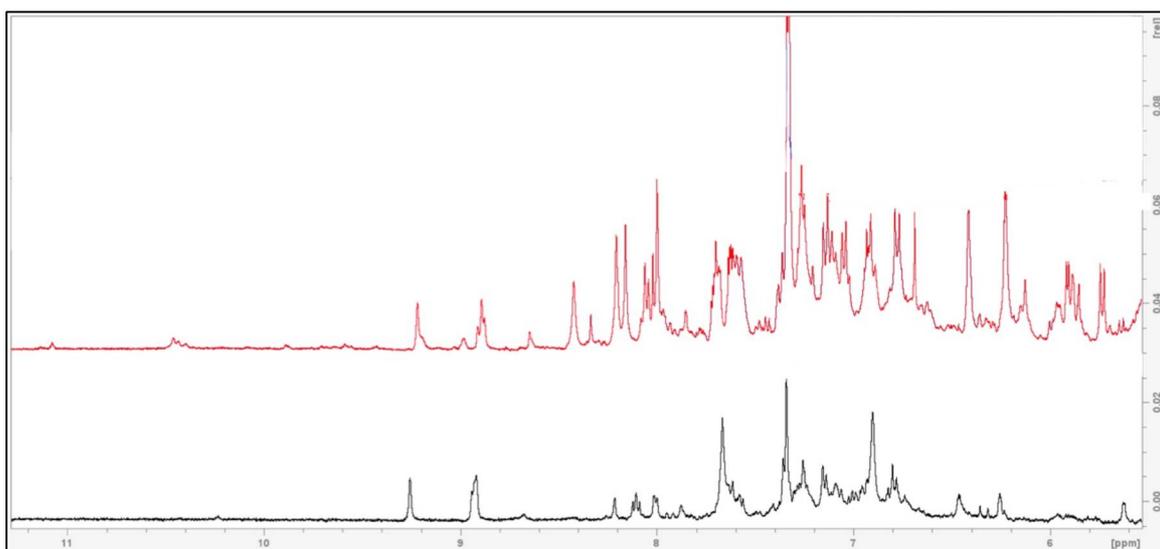
FIGURA 22 - ESPECTRO H RMN DA REGIÃO DE MENOR DESLOCAMENTO QUÍMICO



FONTE: O autor (2024).

Foram também observados sinais de hidrogênios ligados a carbonos sp^2 nos extratos (FIGURA 23), indicando a presença de anéis aromáticos. Cabe novamente o destaque para o extrato das folhas (vermelho), o qual possui mais sinais do que o extrato dos frutos (preto), de modo a sugerir que as folhas contêm algumas moléculas que existem também nos frutos, e outras além.

FIGURA 23 - ESPECTRO H RMN INDICATIVO DE ANÉIS AROMÁTICOS



FONTE: O autor (2024).

TABELA 23 - RESULTADOS DOS ÁCIDOS FENÓLICOS E FLAVONOIDES POR ANÁLISE DE CROMATOGRAFIA EM FASE LÍQUIDA

EXTRATO	<i>ÁCIDO GÁLICO</i>	<i>ÁCIDO CLOROGÊNICO</i>	<i>ÁCIDO CAFEICO</i>	<i>ÁCIDO VANÍLICO</i>	<i>ÁCIDO CUMÁRICO</i>	<i>ÁCIDO FERÚLICO</i>	<i>CATEQUINA</i>	<i>PROCIANIDINA</i>	<i>RUTINA</i>	<i>ISOQUERCETINA</i>
FRUTOS	---	0,077	---	---	0,099	0,061	0,275	---	0,297	0,106
FOLHAS	0,347	0,562	0,152	0,572	0,147	0,628	0,362	0,243	1,381	1,502

FONTE: O autor (2024).

NOTA: Avaliação em HPLC-DAD (mg de composto. g de amostra seca⁻¹). Extrações realizadas a 65°C e 10 minutos.

5 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Medir as propriedades avaliadas com diferentes proporções entre etanol e água como solvente extrator, além da proporção massa de amostra por volume de solvente. Também é válido utilizar outros métodos de extração e realizar a secagem dos frutos em estufa e a secagem das folhas em liofilizador. Outro estudo interessante seria extrair apenas a mucilagem com água a partir do estudo de otimização de extração realizado por Junior e colaboradores (2013) e verificar o potencial inibitório de glicação e oxidação lipídica de forma isolada. A extração utilizando apenas água como solvente extrator é de especial interesse, visto que é o solvente utilizado para cozinhar alimentos em ambiente doméstico.

Verificar quais sacarídeos permanecem em solução após a extração com solução etanólica 70% e realizar pesquisa da relação entre a massa molecular dos sacarídeos e a inibição das reações de glicação e de oxidação lipídica, verificando se há maior potencial conforme a massa molecular diminui, visto que tal correlação foi determinada para sacarídeos extraídos da abóbora.

A condução de testes *in vivo* para verificar essas e outras atividades biológicas, além daquelas que já foram avaliadas em outros estudos, como é o caso de Barbalho e colaboradores (2016) e Pinto e colaboradores (2015), traria resultados importantes para elucidar os efeitos ainda não testados em organismos vivos.

6 CONCLUSÕES

Em síntese do exposto, ficou claro que os extratos de ora-pro-nóbis obtidos por ESL assistida por dispersor de alto cisalhamento a 65°C e 10' com solução hidroetanólica 70% têm atividade antioxidante, anti-lipoxidação e antiglicante. As atividades dos extratos das folhas aparentam estar vinculadas ao seu alto teor de polifenóis, embora os sacarídeos ali existentes devam contribuir em parte para os efeitos observados, uma vez que os extratos dos frutos, mesmo com menor teor de bioativos, apresentaram relevante atividade anti-lipoxidação e antiglicante.

O mecanismo de ação dos sacarídeos ainda não foi completamente elucidado, embora já se saiba que parte dele está relacionado à capacidade de quelar íons metálicos. É possível inferir ainda que a formação de interações eletrostáticas como proteína-sacarídeo, por exemplo, ou a formação de sistemas emulsionados poderiam ter ação protetiva contra as reações de glicação e oxidação lipídica.

O fato de que foram encontrados resquícios de cádmio nas folhas e frutos de ora-pro-nóbis de cultivo orgânico serve como um alerta ambiental para que providências sejam tomadas visando tanto a desintoxicação do solo e lençóis freáticos quanto a monitoração das possíveis causas, evitando contaminações futuras.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, M., SAEED, F., ANJUM, F. M., AZFAAL, M., TUFAIL, T., BASHIR, M., S., ISHTIAQ, A., HUSSAIN, S., SULERIA, H. A. R. Natural polyphenols: An overview. *International Journal of Food Properties*, 20:8, 1689-1699. 2016.
- ABEJE, B. A.; BEKELE, T.; GETAHUN, K. A.; ASRIE, A. B., Evaluation of wound healing activity of 80% hydromethanolic crude extract and solvent fractions of the leaves of *Urtica simensis* in mice. *Journal of Experimental Pharmacology*. 14, 221-241. 2022.
- ADEOLA, H. A.; Bioactive compounds and their libraries: An insight into prospective phytotherapeutics approach for oral mucocutaneous cancers. *Biomed. Pharmacother.*, vol. 141, p. 111809, Sep. 2021.
- ADISAKWATTANA, S.; SOMPONG, W.; MEEPROM, A.; NGAMUKOTE, S.; YIBCHOK-ANUM, S.; Cinnamic acid and its derivatives inhibit fructosamine-mediated protein glycation. *Int J Sci*. 2012.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; Bioactive compounds and healing benefits of Pereskioideae and Cactoideae: A review. *Food Chemistry*. 2020.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; PESSOA, 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 Functional Foods*, 11, 178-184. 2014.
- AGOSTINI-COSTA, T. S.; WONDRAECK, D. C.; ROCHA, W. D. S.; SILVA, D. B.; Carotenoids profile and total polyphenols in fruits of *Pereskia aculeata* Miller. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 34 (1), 234-238, 2012.
- AHDI, M.; GERDES, V. E.; GRAAFF, R.; KUIPERS, S.; SMIT, A. J.; MEESTERS, E. W.; Skin auto fluorescence and complications of diabetes: does ethnic background or skin color matter? *Diabetes Technol. Ther.* 17 (2) 88–95. 2015.
- AHMAD, S.; SIDDIQUI, Z.; REHMAN, S.; KHAN, M. Y.; KHAN, H.; KHANUM, S.; ALOUF, S.; SAEED, M.; A Glycation Angle to Look into the Diabetic Vasculopathy: Cause and Cure, *Curr. Vasc. Pharmacol.* 15 (4) 352–364. 2017.
- AHMED, N.; ARGIROV, O. K.; MINHAS, H. S.; CORDEIRO, C. A.; THORNALLEY, P. J.; Assay of advanced glycation endproducts (AGEs): surveying AGEs by chromatographic assay with derivatization by 6-aminoquinolyl-N-hydroxysuccinimidyl-carbamate and application to Nepsilon-carboxymethyl-lysine- and Nepsilon-(1-carboxyethyl) lysine-modified albumin, *Biochem. J.* 364 (Pt 1) 1–14. 2002.
- AHMED, N.; THORNALLEY, P. J.; Peptide mapping of human serum albumin modified minimally by methylglyoxal in vitro and in vivo. *Annals of the New York Academy of Science*, v. 1043, p. 260-266, 2005.
- 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-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.). *Revista Ceres*, 21 (114), 105-11, 1974.

ALMEIDA-FILHO, J., CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do "ora-pro-nobis" (*Pereskia aculeata* Mill.). *Revista Ceres*, 21 (114), 105-11, 1974.

ALRUBAYE, A.; MOTOVALI-BASHI, M.; MIROLIAEI, M., Rosmarinic acid inhibits DNA glycation and modulates the expression of *Akt1* and *Akt3* partially in the hippocampus of diabetic rats. *Scientific Reports*, 11:20605. 2021.

AMIT, B.; VAIBHAV, V. G.; CHANDAN, D.; Degradation kinetics of anthocyanins from purple rice bran and effect of hydrocolloids on its stability. *Journal of Food Process Engineering*. 2020.

ANDONOVA, L.; GEORGIEVA, M.; ZLATKOV, A.; Free Radicals, oxidative stress, and diseases associated with them. *Pharmacia* 62: 26-39. 1025.

ANDREIS, E.; KULLMER, K.; APPEL, M.; Application of the reference method isotope dilution gas chromatography mass spectrometry (ID/GC/MS) to establish metrological traceability for calibration and control of blood glucose test systems, *J. Diabetes Sci. Technol.* 8 (3) 508–515. 2014.

AOAC (Association of Official Agricultural Chemists); Official Methods of Analysis of AOAC International. 2005.

ARAÚJO, L. M. Purificação e caracterização da proteína GlnB de *Azospirillum brasiliense*. Dissertação de mestrado em Bioquímica, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 2003.

ARISTIZÁBAL, C. E.; VARGAS A. F.; ALVARADO, P. N.; Numerical determination of the correct solvents to extract a phytochemical from coffee pulp using Hansen solubility parameters, risk assessment, sustainability evaluation, and economic analysis. *Dyna*. 2019.

ARYA, V.; ARYA, M. L.; A review on anti-inflammatory plant barks. *Int. J. PharmTech Res.* 2011.

ASHRAF, J. M.; AHMAD, S.; CHOI, I.; AHMAD, N.; FARHAN, G.; TATYANA, G.; SHAHAB, U.; Recent advances in detection of AGEs: Immunochemical, bioanalytical and biochemical approaches. *IUBMB Life* 67 (12) 897–913. 2015.

ASSAR, S. H.; MOLONEY, C.; LIMA, M.; MAGEE, R.; AMES, J. M.; Determination of Ne-(carboxymethyl)lysine in food systems by ultra performance liquid chromatography-mass spectrometry. *Amino Acids*. 2009.

ASVARUT, P.; ZHAO, H.; GU, J.; MA, D.; The role of HMGB1 in inflammation-mediated organ injury. *Acta Anaesthesiol Taiwanica*.; 51:28-33. 2013.

AVEMARIA, F.; CARRERA, P.; LAPOLLA, A.; Possible role of fructosamine 3-kinase genotyping for the management of diabetic patients, *Clin. Chem. Lab. Med.*, vol. 53, nº 9, pp. 1315 – 1320. 2012.

AZAROVA, O. V.; BRYUKHANOV, V. M.; ZVEREV, Y. F.; The pharmacological activity of rosmarinic acid, *Vopr. Biol., Med. Farm. Khim.*, nº 6, pp. 3 – 8. 2010.

BADENHORST, D.; MASEKO, M.; TSOTETSI, O. J.; NAIDOO, A.;

BROOKSBANK, R.; NORTON, G. R.; WOODIWISS, A. J.; Cross-linking influences the impact of quantitative changes in myocardial collagen on cardiac stiffness and remodeling in hypertension in rats. *Cardiovascular Research*, v. 57, p. 632-641, 2003.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMMAN, S. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. *Food Chemistry*, v. 99, n. 1, p. 191–203, 1 jan. 2006.

BALTO, A. S.; LAPIS, T. J.; SILVER, R. K.; FERREIRA, A. J.; BEAUDRY, C. M.; LIM, J.; PENNER, M. H., On the use of differential solubility in aqueous ethanol solutions to narrow the DP range of food-grade starch hydrolysis products. *Food Chemistry*, p. 872-880. 2016.

BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A.; Bioactive components from leaf vegetable products. *Stud. Nat. Prod. Chem.*, vol. 41, pp. 321-346, 2014.

BARBALHO, S. M. et al., *Pereskia acuelata* Miller Flour: Metabolic Effects and Composition. *J Med Food* 19 (9), 1-5. 2016.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T.; O papel dos produtos finais de glicação avançada (AGEs) no desencadeamento das complicações vasculares do diabetes., *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, 52, 940. 2008.

BARBOSA, J. H. P.; OLIVEIRA, S. L.; SEARA, L. T.; Produtos de glicação avançada (AGEs) dietéticos e as complicações do diabetes., *Rev. Nutr.* 2009.

BARREIRA, T. F.; *et al.*, Nutrient content in ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.): unconventional vegetable of the Brazilian Atlantic Forest. *Food Science and Technology*. 2020.

BARRY, A. L.; THORNSBERRY, C.; Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. *Manual of clinical microbiology*. 5^a ed. Washington, DC. 1991.

BASILE, A.; LIPNIZKI, F.; RAHIMPOUR, M. R.; PIEMONTE, V.; Current trends and future developments on (bio-) membranes: advances on membrane engineering. Elsevier. 2024.

BASTA, G.; SCHMIDT, A. M.; CATERINA, R. D.; Advanced glycation end products and vascular inflammation: implications for accelerated atherosclerosis in diabetes. *Cardiovascular research*, v. 63, p. 582-592, 2004.

BATISTA, A. G., *et al*, Red-jambo (*Syzygium malaccense*): Bioactive compounds in frutis and leaves. *LWT – Food Science and Technology*, p. 284-291. 2017.

BELON, E.; BOISSON, M.; DEPORTES, I. Z.; EGLIN, T. K.; FEIX, I.; BISPO, A. O.; GALSOMIES, L.; LEBLOND, S.; GUELLIER, C. R.; An inventory of trace elements inputs to French agricultural soils. *Sci. Total Environ.* 439, p. 87-95. 2012.

BENZIE, I. F. F.; STRAIN, J. J., The ferric reducing ability of plasma (FRAP) as a measure of “antioxidant power”. The FRAP assay. *Analytical Biochemistry*,

1996.

BERK, Z., Braverman's introduction to the biochemistry of foods. Amsterdam: Elsevier. 1976.

BERK, Z., Food Process Engineering and Technology. [s.l.: s. n.].

BERTON, C.; ROPERS, M. H.; GUILBERT, D.; SOLÉ, V.; GENOT, C.; Modifications of interfacial proteins in oil-in-water emulsions prior to and during lipid oxidation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 60 (35), 8659-8671. 2012.

BIGALKE, M.; ULRICH, A.; REHMUS, A.; KELLER, A.; Accumulation of cadmium and uranium in arable soils in Switzerland. *Environ. Pollut.* 221, p. 85-93. 2017.

BLOOD, V. S. C. G. D. Saunders Comprehensive Veterinary Dictionary, 4th edition. Saunders L ed. [s.l.: s. n.]. v. 59

BONILLA, J.; VARGAS, F. C.; DE OLIVEIRA, T. G.; MAKISHI, G. L. A.; SOBRAL, P. J. A.; Recent patents on the application of bioactive compounds in food: a short review. *Curr. Opin. Food Sci.*, vol. 5, pp. 1-7, Oct. 2015.

BOTREL, N.; FREITAS, S.; FONSECA, M. J. O.; MELO, R. A. C.; MADEIRA, N. Valor nutricional de hortaliças folhosas não convencionais cultivadas no Bioma Cerrado. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2020.

BOYER, F.; VIDOT, J. B.; DUBOURG, A. G.; RONDEAU, P.; ESSOP, M. F.; BOURDON, E.; Oxidative stress and adipocyte biology: focus on the role of AGEs. *Oxid. Med. Cell. Longevity*. 98, 135. 2015.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT – Food Science and Technology*. 1995.

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

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, 484 p., 2015.

BREWER, M. S. Natural Antioxidants: Sources, Compounds, Mechanisms of Action, and Potential Applications. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, v. 10, n. 4, p. 221–247, 2011.

BROWNLEE, M. Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications. *Nature*, 414, 813. 2001.

BROWNLEE, M. The Pathobiology of Diabetic Complications: An Unifying Mechanism. *Diabetes*, 54, 1615. 2005.

- BROWNLEY, C. A.; LACHMAN, L.; Use of 2-thiobarbituric acid — Malonaldehyde reaction as a measure of antioxidant effectiveness in pharmaceutical oils. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 54(10), 1480– 1487. 1965.
- BUBB, W. A., NMR Spectroscopy in the Study of Carbohydrates: Characterizing the Structural Complexity. School of Molecular and Microbial Biosciences, University of Sydney, New South Wales, Australia. 2006.
- BUDANTSEV, A. L.; LESIOVSKAYA, E. E.; Rosmarinic acid: sources and biological activity. *Rastit. Resur.* Vol. 48, n° 3, pp. 453 – 468. 2012.
- CAI, J.; CHEN, Z.; WU, W.; LIN, Q.; LIANG, Y.; High animal protein diet and gut microbiota in human health. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, p. 6225-5237. 2021.
- CAI, Q.; LI, B. Y.; GAO, H. Q.; ZHANG, J. H.; WANG, J. F.; YU, F.; YIN, M.; ZHANG, Z.; Grape seed procyanidin b2 inhibits human aortic smooth muscle cell proliferation and migration induced by advanced glycation end products. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75:1692-7. 2011.
- CARBONELL-CAPELLA, J. M.; BUNIEWSKA, M.; BARBA, F. J.; ESTEVE, M. J.; FRÍGOLA, A.; Analytical methods for determining bioavailability and bioaccessibility of bioactive compounds from fruits and vegetables: A review. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.*, vol. 13, no. 2, pp. 155-171. 2014.
- CARINA BILUCA, F. et al. Investigation of phenolic compounds, antioxidant and anti-inflammatory activities in stingless bee honey (Meliponinae). *Food Research International*, p. 108756, 27 nov. 2019.
- CARVALHO, E. G. *et al*, Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 24, n. 6, p. 677-682. 2014.
- CARTA, G.; Heat and Mass Transfer for Chemical Engineers, Principles and Applications. McGraw Hill. 2021.
- CERAMI, A.; Hypothesis: glucose as a mediator of aging. *J. Am. Geriatr. Soc.* 33, 626. 1985.
- CHEN, C.; ZHANG, J.; LI L.; GUO, M.; HE, Y.; DONG, Y.; MENG, H.; YI, F.; Advanced Glycation End Products in the Skin: Molecular Mechanisms, Methods of Measurement, and Inhibitory Pathways. *Frontiers in Medicine; Dermatology*. University of Milan. 2022.
- CHELLAIAH, E. R.; Cadmium (heavy metals) bioremediation by *Pseudomonas aeruginosa*: a mini-review. *Appl. Water Sci.*, 8, 154. 2018.
- CHEYNIER, V. Phenolic compounds: From plants to foods. *Phytochemistry Reviews*, v. 11, n. 2–3, p. 153–177, 2012.
- CHOMPOO, J.; UPADHYAY, A.; KISHIMOTO, W.; MAKISE, T.; TAWATA, S.;

Advanced glycation end products inhibitors from *Alpinia Zerumbet* rhizomes. *J Food chem*, 129:709-715. 2011.

CHONG, S. A. C.; LEE, W.; ARORA, P. D.; LASCHINGER, C.; YOUNG, E. W.; SIMMONS, C. A.; MANOLSON, M.; SODEK, J.; MCCULLOCH, C. A.; Methylglyoxal Inhibits the Binding Step of Collagen Phagocytosis. *J. Biol. Chem.* 282, 8510. 2007.

CIDDI, V.; DODDA, D.; Therapeutic potential of resveratrol in diabetic complications: In vitro and in vivo studies. *Pharmacol Rep.* 66:799-803. 2014.

CLSI. Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement Clinical and Laboratory Standards Institute. [s.l.: s.n.]. v. 32

COLLARD, F.; DELPIERRE, G.; STROOBANT, V.; MATTHIJS, G.; SCHAFTINGEN, E.; A mammalian protein homologous to fructosamine-3-kinase is a ketosamine-3-kinase acting on a psicossamines and ribulosamines but not on fructosamines. *Diabetes*, 52, 2888. 2003.

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.

CORICA, D.; AVERSA, T.; RUGGERI, R. M.; CRISTANI, M.; ALIBRANDI, A.; PEPE, G.; DELUCA, F.; WASNIEWSKA, M.; Could AGE/RAGE-Related Oxidative Homeostasis Dysregulation Enhance Susceptibility to Pathogenesis of Cardio-Metabolic Complications in Childhood Obesity? *Front Endocrinol (Lausanne)* 10 426. 2019.

CORRÊA, R. C.; BARROS L.; FERNANDES, Â.; SOKOVIC, M.; BRACHT, A.; PERALTA, R. M.; FERREIRA, I. C.; A natural food ingredient based on ergosterol: Optimization of the extraction from *Agaricus blazei*, evaluation of bioactive properties and incorporation in yogurts. *Food & Function*, 9, 1465-1474. 2018.

CZARNEK, K.; TERPILOWSKA, S.; SIWICKI.; Selected aspects of the action of cobalt ions in the human body. *Cent Eur J Immunol.* 2015.

DAYRELL, M. S.; Extração e estudo do valor nutritivo de proteínas de folha de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.). Tese de Doutorado em Ciências. Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG. 1977.

DELPPIERRE, G.; RIDER, M. H.; COLLARD, F.; STROOBANT, V.; VANSTAPEL, F.; SANTOS, H.; SCHAFTINGEN, E.; *Diabetes*, 2000.

DEMILEW, W.; ADINEW, G. M.; ASRADE, S.; Evaluation of the wound healing activity of the crude extract of leaves of *Acanthus Polystachyus* Delile (Acanthaceae). *Evid-Based Compl Alt Med.* 2018.

DE SANTIAGO, E.; JUÁNIZ, I.; CID, C.; DE PEÑA, M. P., Extraction of (Poly)phenolic compounds of Cactus (*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.) Cladodes.

Food Analytical Methods. 2020.

DEVATKAL, S. K.; NARSAIAH, K.; BORAH, A. Anti-oxidant effect of extracts of kinnow rind, pomegranate rind and seed powders in cooked goat meat patties. **Meat Science**, v. 85, n. 1, p. 155–159, 2010.

DHINGRA, D. et al. Dietary fiber in foods: a review. *Journal of Food Science and Technology*, v. 49, n. 3, p. 255-266, 2012.

DIAZ, P.; JEONG, S. C.; LEE, S.; KHOO, C.; KOYYALAMUDI, S. R.; Antioxidant and anti-inflammatory activities of selected medicinal plants and fungi containing phenolic and flavonoid compounds. *Chin. Med.* 2012.

DO, Q.; ANGKAWIJAYA, A.; TRAN-NGUYEN, P.; HUNYH, L.; SOETAREDJO, F.; ISMADJI, S.; JU, Y.; Effect of extraction solvent on total phenol content, total flavonoid content, and antioxidant activity of *Limnophila aromatica*. *J. Food Drug Anal.*, 22(3), p. 296-302. 2014.

DO NASCIMENTO, T. C.; JACOB-LOPES, E.; ZEPKA, L. Q.; An Overview on Bioactive Compounds with Focus in the Biosynthesis, Characterization and Applications. 2021.

DOBLE, M. *et al*, Alternative Solvents. *Green Chemistry and Engineering*, p. 93-104. 2007.

DOMINGUES, R. M.; DOMINGUES, P.; MELO, I.; PÉREZ-SALA, D.; REIS, A.; SPICKETT, C. M.; Lipoxidation adducts with peptides and proteins: Deleterious modifications or signaling mechanisms? *Proteomics*. 110, 92. 2013.

DUARTE, M.R.; HAYASHI, S.S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Mill (Cactaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 15 (2), 103-09, 2005.

DUNN, J. A.; MCCANCE, D. R.; THROPE, S. R.; LYONS, T. J.; BAYNES, J. W.; Age-dependent accumulation of N.epsilon.-(carboxymethyl)lysine and N.epsilon.-(carboxymethyl)hydroxylysine in human skin collagen. *Biochemistry*, 30, 1205. 1991.

ELOSTA, A.; GHOUS, T.; AHMED, N.; Natural products as antiglycation agents: possible therapeutic potential for diabetic complications, *Curr. Diabetes Rev.*, vol. 8, n° 2, pp. 92 – 108. 2012.

EMEL'YANOV, V. V.; MAKSIMOVA, N. E.; MOCHUL-SKAYA, N. N.; CHERESHNEV, V. A.; Nonenzymatic glycosylation of proteins: chemistry, pathophysiology, and prospects for correction, *Vopr. Biol. Med. Farm. Khim.*, n° 1, pp. 3 – 15. 2010.

EMEL'YANOV, V. V.; Non-enzymatic glycosylation of proteins and skin aging, *Mezoterapiya*, n° 4, pp. 54 – 65. 2010.

ENGELN, L.; STEHOUWER, C. D.L SCHALKWIK, C. G.; Current therapeutic interventions in the glycation pathway: evidence from clinical studies, *Diabetes*,

Obes. Metab., vol. 15, nº 8, pp. 677-689, 2013.

EXLEY, C.; *Encyclopedia of Metalloproteins*. Springer, p. 33-34. 2013.

FAN, X.; RENEKER, L. W.; OBRENOVICH, M. E.; STRAUCH, C.; CHENG, R.; JARVIS, S. M.; ORTWERTH, B. J.; MONNIER, V. M.; Vitamin C mediates chemical aging of lens crystallins by the Maillard reaction in a humanized mouse model. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2006.

FANZO, J.; A research vision for food systems in the 2020s: Defying the status quo. *Glob. Food Sec.*, vol. 26, p. 100397, Sep. 2020.

FENNEMA, O. R.; DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L. *Fennema's Food Chemistry* (4th Edition). [s.l: s.n.].

FERNANDES, P. A. R.; COIMBRA, M. A., The antioxidant activity of polysaccharides: A structure-function relationship overview. *Carbohydrate Polymers*. 2023.

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*. 2019.

FOGAÇA, M. B.; FRANCO, T. S.; FLORES-SAHAGUN, T. H. S.; Estudo cinético de secagem de folhas de *Phormium tenax* para uso em compósitos poliméricos. *Revista de Engenharia e Tecnologia*, v 13, n 1. 2021.

FREIDJA, M. L.; VESSIERES, E.; TOUTAIN, B.; GUIHOT, A. L.; CUSTAUD, M. A.; LOUFRANI, L.; FASSOT, C.; HENRION, D.; AGEs breaking and antioxidant treatment improves endothelium-dependent dilation without effect on oω-mediated remodeling of resistance arteries in old Zucker diabetic rats, *Cardiovasc Diabetol* 13 55. 2014.

FU, Y.; LUO, J.; QIN, J.; YANG, M.; Screening techniques for the identification of bioactive compounds in natural products. *J. Pharm. Biomed. Anal.*, vol. 168, pp. 189-200, 2019.

FUJIMOTO, N.; HASTINGS, J. L.; GARRICK-RANSON, G.; Cardiovascular effects of 1 year of alagebrium and endurance exercise training in healthy older individuals, *Circ.: Heart Failure*, vol. 6, no 6, pp. 1155-1164. 2013.

GARCÍA, A. *et al.* Extraction of phenolic compounds from virgin olive oil by deep eutectic solvents (DESS). *Food Chemistry*. 2016.

MARSH, K. N. *et al.*, Room Temperature Ionic Liquids as Replacements for Conventional Solvents – A Review. *Korean Journal of Chemical Engineering*. 2002.

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.;

GEBHARDT, C.; RIEHL, A.; DURCHDEWALD, M.; NÉMETH, J.; FURSTENBERGER, G.; MULLER-DECKER, K.; ENK, A.; ARNOLD, B.;

BIERHAUS, A.; NAWROTH, P. P.; HESS, J.; ANGEL, P.; RAGE signaling sustains inflammation and promotes tumor development. *J. Exp. Med.* 205, 275. 2008.

GENUTH, S.; SUN, W.; CLEARY, P.; GAO, X.; SELL, D. R.; LACHIN, J.; GROUP, D. E. R.; MONNIER, V. M.; Skin advanced glycation end products glucosepane and methylglyoxal hydroimidazolone are independently associated with long-term microvascular complication progression of type 1 diabetes, *Diabetes* 64 (1) 266–278. 2015.

GHOSH, P.; PARVEEN, S.; CHAUDHURY, S.; DASGUPTA, S.; Polyphenol loaded nanoparticles as antiglycating agents: a case study with human serum albumin. *Asia Chem.*, 66-77. 2023.

GIUSTI, M. M.; WROLSTAD, R. E.; Characterization and Measurement of Anthocyanins by UV-Visible Spectroscopy. In: Giusti, M. M. and Wrolstad, R. E., Eds., *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, n.1, p. F1. 2.1-F1. 2.13, 2001.

GOLDBERG, T.; CAI, W.; PEPPA, M.; DARDAINE, V.; BALIGA, B. S.; URIBARRI, J.; VLASSARA, H.; Advanced glycoxidation end products in commonly consumed foods., *J. Am. Diet. Assoc.*, 104, 1287. 2004.

GOLDIN, A.; BECKMAN, J. A.; SCHMIDT, A. M.; CREAGER, M. A.; Advanced Glycation End Products Sparking the Development of Diabetic Vascular Injury., *Circulation*, 114, 597. 2006.

GONÇALVES, F. J., *et al*, Interaction of wine mannoproteins and arabinogalactans with anthocyanins. *Food Chemistry*. 2018.

GONÇALVES, J. P. Z. *et al*, Quantificação de proteínas e análise de cinzas encontradas nas folhas e caule da ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller), p. 3127-3132, 2015.

GONZALEZ-RIVERA, M. L.; BARRAGAN-GALVEZ, J. C.; GASCA-MARTÍNEZ, D.; HIDALGO-FIGUEROA, S.; ISIODIA-ESPINOZA, M.; ALONSO-CASTRO, A. J., In vivo neuropharmacological effects of neophytadiene. *Molecules*. 2023.

GRANT, C. A.; Influence of phosphate fertilizer on cadmium in agricultural soils and crops. *Pedologist*. 3, p. 143-155. 2011.

GREIFENHAGEN, U.; NGUYEN, V. D.; MOSCHNER, J.; GIANNIS, A.; FROLOV, A.; HOFFMANN, R.; Sensitive and site-specific identification of carboxymethylated and carboxyethylated peptides in tryptic digests of proteins and human plasma, *J. Proteome Res.* 14 (2) 768–777. 2015.

GROENER, J. B.; RELSMAN, P.; FLEMING, T.; C332C genotype of glyoxalase 1 and its association with late diabetic complications, *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes*, vol. 121, n° 7, pp. 426 – 439. 2013.

GUERIN-DUBOURG, A.; COURNOT, M.; PLANESSE, C.; DEBUSSCHE, X.; MEILHAC, O.; RONDEAU, P.; BOURDON, E.; Association between Fluorescent Advanced Glycation End-Products and Vascular Complications in Type 2

Diabetic Patients, *Biomed Res. Int.* 2017 7989180. 2017.

GUO, X.; MENG, H.; TANG, Q.; PAN, R.; ZHU, S.; YU, S., Effects of the precipitation pH on the ethanolic precipitation of sugar beet pectins. *Food Hydrocolloids*, p. 431-437. 2016.

GUPTA, A.; KUMAR, R.; GANGULY, R.; SINGH, A. K.; RANA, H. K.; PANDEY, A. K.; Antioxidant, anti-inflammatory and hepatoprotective activities of *Terminalia bellirica* and its bioactive component ellagic acid against diclofenac induced oxidative stress and hepatotoxicity. *Toxicol. Reports*, vol. 8, pp. 44-52, Jan. 2021.

HABIBI, Y.; MAHROUZ, M.; MARAIS, M. F.; VIGNON, M. R., An arabinogalactan from the skin of *Opuntia ficus-indica* prickly pear fruits. *Carbohydrate Research*, v. 339 p. 1201-1205. 2004.

HALLIWELL, B. Antioxidants and Human Disease: A General Introduction. *Nutrition Reviews*, v. 55, n. 1, p. S44–S49, 2009.

HARJA, E.; BU, D. X.; HUDSON, B. I.; CHANG, J. S.; SHEN, X.; HALLAM, K.; KALEA, A. Z.; LU, Y.; ROSARIO, R. H.; ORUGANTI, S.; NIKOLLA, Z.; BELOV, D.; LALLA, E.; RAMASAMY, R.; YAN, S. F.; SCHMIDT, A. M.; Vascular and inflammatory stresses mediate atherosclerosis via RAGE and its ligands in apoE^{-/-} mice. *The Journal of Clinical Investigation*, v. 118, p. 183-194, 2008.

HE, C. J., Sabol, J., Mistuhashi, T., Vlassara, H., *Diabetes* 1999, 48, 1308.

HEIN, G. E.; Glycation endproducts in osteoporosis – Is there a pathophysiologic importance? *Clin. Chim. Acta.* 371, 32. 2006.

HELLWIG, M.; HANLE, T.; Baking, Ageing, Diabetes: A Short History of The Maillard Reaction., *Angew Chem. Int. Ed.* 2014.

HEMATYAR, N.; RUSTAD, T.; SAMPELS, S.; KASTRUP, T. D.; Relationship between lipid and protein oxidation in fish. *Acquaculture Research*, 50 (5), 1393-1403. 2019.

HENLE, T.; Maillard reaction of proteins and advanced glycation end products (AGEs) in food. *Mol. Nutr. Food Res.* 2007.

HIDALGO, F. J.; ZAMORA, R.; Interplay between the maillard reaction and lipid peroxidation in biochemical systems. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2005.

HK, B.; Bioactive compounds: Definition and assesment of activity. *Nutrition*, vol. 25, no. 11-12, pp. 1202-1205, Nov. 2009.

HOFF, H. F.; O'NEIL, J.; WU, Z. P.; HOPPE, G.; SALOMON, R. L.; Phospholipid hydroxyalkenals – Biological and chemical properties of specific oxidized lipids presente in atherosclerotic lesions. *Arterioscler., Thromb., Vasc. Biol.* 23, 275, 2003.

HONGFEI, M.; WANG, D.; XUE, Y.; ZHANG, Z.; NIU, J.; HONG, Y.; DRLICA, K.; ZHAO, X.; Dymethyl Sulfoxide Protects *Escherichia coli* from Rapid Antimicrobial-

Mediated Killing. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 5054 – 5058, vol 60, n 8. 2016.

HUANG, J. S.; GUH, J. Y.; CHEN, H. C.; HUNG, W. C.; LAI, Y. H.; CHUANG, L. Y.; Role of receptor for advanced glycation end-product (RAGE) and the JAK/STAT signaling pathway in AGE-induced collagen production in NRK-49F cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, v. 81, p. 102-113, 2001.

HURTADO-SANCHEZ, C.; ESPINOSA-MANSILLA, A.; RODRIGUEZ-CACERES, M. I.; MARTIN-TORNERO, E.; DURAN-MERAS, I.; Development of a method for the determination of advanced glycation end products precursors by liquid chromatography and its application in human urine samples, *J. Sep. Sci.* 35 (19) 2575–2584. 2012.

HUTTUNEN, H. J.; FAGES, C.; RAUVALA, H.; Receptor for advanced glycation end products (RAGE)-mediated neurite outgrowth and activation of NF- κ B require the cytoplasmic domain of the receptor but different downstream signaling pathways. *The Journal of Biological Chemistry*, v. 274, p. 19919-19924, 1999.

HSIEH, Y.; *et al*, Ultrasonication-assisted synthesis of alcohol-based deep eutectic solvents for extraction of active compounds from ginger. *Ultrasonics Sonochemistry*, v. 63, p. 104915. 2020.

IAL (Instituto Adolfo Lutz), Métodos físico-químicos para análise de alimentos, 4ª ed. 2008.

ISLAM, M. A. et al., Phytochemical profile and antioxidant activity of *Dracocephalum moldavica* L. seed extracts using different extraction methods. *Food Chemistry*, v. 350, 128531, 2021.

ISLAM, M. R.; MANNAN, M. A.; KABIR, M. H. B.; ISLAM, A.; OLIVAL, K. J.; Analgesic, anti-inflammatory and antimicrobial effects of ethanol extracts of mango leaves. *J. Bangladesh Agril. Univ.* 2010.

JACOB, R.; Three eras of vitamin C discovery. *Subcell Biochem* 25: 1-16. 1996.

JEAN, D; POULIGON, M.; DALLE, C.; Evaluation in vitro of AGE-cross links breaking ability of rosamrinic acid, *Glycative Stress Res.*, vol. 2, no. 4, pp. 204-207. 2015.

Jl, X.; Bioactive compounds from herbal medicines to manage dyslipidemia. *Biomed. Pharmacother.*, vol. 118, p. 109338, Oct. 2019.

JIMÉNEZ-AGUILAR, D. M.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, J. M.; HERNÁNDEZ-BRENES, C.; GUTIÉRREZ-URIBE, J. A.; WELTI-CHANES, J.; Dietary fiber, phytochemical composition and antioxidant activity of Mexican commercial varieties of cactus pear. *Journal of Food Composition and Analysis*, vol. 41, p. 66-73. 2015.

JOVÉ, M.; MOTA-MARTORELL, N.; PRADAS, I.; MANTÍN-GARI, M.; AYALA, V.; PAMPLONA, R.; The advanced lipoxidation end-product malondialdehyde-lysine in aging and longevity. *Antioxidants*. 2020.

JUNIOR, F. A. L.; CONCEIÇÃO, M. C.; RESENDE, J. V.; JUNQUEIRA, L. A.; PEREIRA, C. G.; PRADO, M. E. T., Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia acuelata* Miller. *Food Hydrocolloids*, p. 38-47. 2013.

KAMEYA, M.; SAKAGUCHI-MIKAMI, A.; FERRI, S.; Advancing the development of glycated protein biosensing technology: next generation sensing molecules, *J. Diabetes Sci. Technol.*, vol. 9, nº 2, pp. 183 – 191. 2015.

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

KHADER, V.; RAMA, S.; Effect of maturity on micromineral content of selected leafy vegetables. *Journal of Clinical Nutrition*, v. 12, n. 1, p. 45-49. 2003.

KHALIQ, A.; SABIR, S. M.; AHMAD, S. D.; BOLIGON, A. A.; ATHAYDE, M. L.; JABBAR, A.; QAMAR, I.; KHAN, A.; Antioxidant activities and phenolic composition of Olive (*Olea europaea*) leaves, *Journal of Applied Botany and Food Quality* 88, 16-21. 2015.

KHAZAEI, M.; KARIMI, J.; SHEIKH, N.; GOODZARZI, M. T.; SAIDIJAM, M.; KHODADADI, I.; MORIDI, H.; Effects of resveratrol on receptor for advanced glycation end products (RAGE) expression and oxidative stress in the liver of rats with type 2 diabetes. *Phytother Res.* 30:66-71. 2016.

KHLEBNIKOV, A. I.; SCHEPETKIN, I. A.; DOMINA, N. G.; KIRPOTINA, L. N.; QUINN, M. T.; Improved quantitative structure-activity relationship models to predict antioxidant activity of avonoids in chemical, enzymatic, and cellular systems. *Bioorg Med Chem* 15: 1749-1770. 2007.

KIM, T.; SPIEGEL, D. A.; The unique reactivity of N-phenacyl-derived thiazolium salts toward alpha-dicarbonyl compounds, *Rejuvenation Res.*, vol. 16, no 1, pp. 43-50. 2013.

KIM, Y. O.; LEE, S. W.; NA, S. W.; PARK, H. R.; SON, E. S.; Anti-inflammatory effects of *Portulaca oleracea* L. on the LPS-induced RAW 264.7 cells. *J. Med. Plants Res.* 2015.

KINUPP, V. F., LORENZI, H. Plantas alimentícias não convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas. São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora, 768 p. 2014.

KIRKHAM, P. A.; BARNES, P. J.; Oxidative stress in COPD. *Chest*, 144, 266. 2013.

KLINDER, A.; SHEN, Q.; HEPPEL, S.; LOVEGROVE, J. A.; ROWLAND, I.; TUOHY, K. M. Impact of Increasing Fruit and Vegetables and Flavonoid Intake on the Human Gut Microbiota. **Food and Function**. 7 (4), 1788-1796. 2016.

KNIGHT, J.; Free radicals: Their history and current status in aging and disease.

Ann Clin Lab Sci 28: 331-346. 1998.

KONG, X.; WANG, G. D.; MA, M. Z.; DENG, R. Y.; GUO, L. Q.; ZHANG, J. X.; YANG, J. R.; SU, Q.; Sesamin ameliorates advanced glycation end products-induced pancreatic beta-cell dysfunction and apoptosis. *Nutrients.*; 7:4689-704. 2015.

KORETZKY, M. D.; Engineering and Chemical Thermodynamics. John Wiley & Sons. 2nd ed. 2012.

KOSCHINSKY, T.; HE, C.; MITSUHASHI, T.; BUCALA, R.; LIU, C.; BUENTING, C.; HEITMANN, K.; VLASSARA, H.; Orally absorbed reactive glycation products (glycotoxins): an environmental risk factor in diabetic nephropathy., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 94, 6474, 1997.

KOUSAR, S.; SHEIKH, M. A.; ASGHAR, M.; Antiglycation activity of thiamin-HCl and benfotiamine in diabetic condition, *J. Pak. Med. Ass.*, 2012, vol. 62, n° 10, pp. 1033 – 1038. 2012.

KRISHNAMOORTHY, D.; HOY, R. C.; NATELSON, D. M.; TORRE, O. M.; LAUDIER, D. M.; IATRIDIS, J. C.; ILLIEN-JUNGER, S.; Dietary advanced glycation end-product consumption leads to mechanical stiffening of murine intervertebral discs, *Dis Model Mech* 11 (12). 2018.

KUBIER, A.; WILKIN, R. T.; PICHLER, T.; Cadmium in soils and groundwater: a review. *Appl. Geochem.* 2019.

KULKARNI, M. J.; KORWAR, A. M.; MARY, S.; Glycated proteome: from reaction to intervention: review, *Proteomics Clin. Appl.*, vol. 7, pp. 155 – 170. 2013.

KUMAGAI, T.; NANGAKU, M.; KOJIMA, I.; NAGAI, R.; INGELFINGER, J. R.; MIYATA, T.; FUJITA, T.; IANGI, R.; Glyoxalase I overexpression ameliorates renal ischemia-reperfusion injury in rats. *Am J Physiol Renal Physiol.* 296:F912-21. 2009.

LABUZA, T. P.; *et al.*; Water acitivity determination: a collaborative study of different methods. *Journal of Food Science*, 41, n 4, 910-917. 1976.

LAROQUE, D.; INISAN, C.; BERGER, C.; VOULAND, E.; DUFOSSÉ, L.; GUÉRARD, F.; Kinetic study on the Maillard reaction. Consideration of sugar reactivity. *Food Chem.* 2008.

LATA, S.; KAUR, H. P.; MISHRA, T.; Cadmium bioremediation: a review. *Int. J. Pharm. Sci. Res.* 10, p. 4120-4128. 2019.

LEDL, F.; SCHLEICHER, E.; New aspects of the Maillard reaction in foods and in the human body., *Angew. Chem. Int. Ed.* 1990.

LEHNINGER, N. D.; COX, M. M.; Principles of Biochemistry. 8a ed. 2021.

LESLIE, R. D.; BEYAN, H.; SAWTELL, P.; BOEHM, B. O.; SPECTOR, T. D.; SNIEDER, H.; Level of an advanced glycation end product is genetically determined. A study of normal twins. 2003.

LI, D.; LI, B.; MA, Y.; SUN, X.; LIN, Y.; MENG, X.; Polyphenols, anthocyanins, and flavonoids contents and the antioxidant capacity of various cultivars of highbush and half-high blueberries. *Journal of Food Composition and Analysis*, 62, 84–93. 2017.

LI, D.; MITSUHASHI, S.; UBUKATA, M.; Protective effects of hesperidin derivatives and their stereoisomers against advanced glycation end-products formation. *Pharm Biol.* 50: 1531-5. 2012.

LI, J.; LIU, D.; SUN, L.; LU, Y.; ZHANG, Z.; Advanced glycation end products and neurodegenerative diseases: mechanisms and perspective. *J. Neurol. Sci.* 317,1. 2012.

LI, X.; ZHENG, T.; SANG, S.; LV, L.; Quercetin inhibits advanced glycation end product formation by trapping methylglyoxal and glyoxal. *J Agric Food Chem.* 62:12152-8. 2014.

LINDAHL, B.; TOSS, H.; SIEGBAHN, A.; VENGE, P.; WALLENTIN, L.; Markers of myocardial damage and inflammation in relation to long-term mortality in unstable coronary artery disease. FRISC Study Group. *Fragmin during Instability in Coronary Artery Disease.* *New Engl J Med.*; 343:1139-1147. 2000.

LISIWESKA, Z.; GEGCZYNSKI, P.; BERNÁS, E.; KMIECIK, W.; Retention of mineral constituents in frozen leafy vegetables prepared for consumption. *Journal of Food Composition and Analysis*, v. 22, n. 3, p. 218-223. 2009.

LITWINOFF, E.; HURTADO DEL POZO, C.; RAMASAMY, R.; SCHMIDT, A. M.; Emerging Targets for Therapeutic Development in Diabetes and Its Complications: The RAGE Signaling Pathway. *Clin. Pharmacol. Ther.* 98, 135. 2015.

LIU, Y.; HE, X. Q.; HUANG, X.; DING, L.; XU, L.; SHEN, Y. T.; ZHANG, F.; ZHU, M. B.; XU, B. H.; QI, Z. Q.; WANG, H. L.; Resveratrol protects mouse oocytes from methylglyoxal-induced oxidative damage. *PLoS One.*; e77960. 2013.

LO, C. Y.; HSIAO, W. T.; CHEN, X. Y.; Efficiency of trapping methylglyoxal by phenols and phenolic acids. *J Food Sci.* 76:H90-6. 2011.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N.; Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. *Pharmacognosy reviews* 4: 118-126. 2010.

LV, L.; CHENG, Y.; ZHENG, T.; XIAOMING, L.; ZHAI, R., Purification, antioxidant activity and antiglycation of polysaccharides from *Polygonum multiflorum* Thunb. *Carbohydrate Polymers.* 2014.

LV, L.; SHAO, X.; WANG, L.; HUANG, D.; HO, C. T.; SANG, S.; Stilbene glucoside from *Polygonum multiflorum* Thunb.: a novel natural inhibitor of advanced glycation end product formation by trapping of methylglyoxal. *J Agric Food Chem.* 58:2239-45. 2010.

MA, S.; SH, S.; K, S.; JS, Y.; Antibacterial Properties and Effects of Fruit Chilling and Extract Storage on Antioxidant Activity, Total Phenolic and Anthocyanin

Content of Four Date Palm (*Phoenix dactylifera*) Cultivars. *Molecules*, vol. 21, no. 4, Apr. 2016.

MACHAHUA, C.; MONTES-WORBOYS, A.; LLTAJOS, R.; ESCOBAR, I.; DORCA, J.; MOLINA-MOLINA, M.; VICENS-ZYGMUNT, V.; AGE-RAGE ratio in idiopathic pulmonary brosis, *Respir. Res.* 17 (1) 144. 2016.

MACIEL, M. S. F.; FREITAS, P. H. S.; ALMEIDA, M. A.; DA SILVA, N. P.; TAVARES, G. D.; COSTA, J. C.; SCIO, E., *Pereskia aculeata* Miller (*Cactaceae*): A non-conventional food plant with medicinal potential. *Brazilian Journal of Health and Pharmacy*, v. 5, n. 2, p. 1-14. 2023.

MADEIRA, N. R., SILVA, P. C., BOTREL, N., MENDONÇA, J. L. de, SILVEIRA, G. S. R., PEDROSA, M. W. **Manual de produção de Hortaliças Tradicionais**. Brasília, DF: Embrapa, 155p., 2013.

MAHAN, K. L.; STUMP-SCOTT, S.; Krause: Alimentos, Nutrição e Dietoterapia. 11 ed. São Paulo: Roca, cap. 11, p. 271-280. 2005.

MAILLARD, L. C.; *C. R. Chim*, 154, 66. 1912.

MARC, F.; DAVIN, A.; DEGLÈNE-BENBRAHIM, L.; FERRAND, C.; BACCAUNAUD, M.; Studies of several analytical methods for antioxidant potential evaluation in food. *Medecine Sciences: M/S*, 20, 458–463. 2004.

MARSARO-JÚNIOR, A. L., SOUZA-FILHO, M. F., ADAIME, R., STRIKIS, P. C. First report of natural infestation of *Pereskia aculeata* Mill. (*cactaceae*) by *Ceratitis capitata* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) in Brazil. *Revista de Agricultura*, 86 (2), 151-154, 2011.

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*, 70, p. 20-28. 2017.

MARTINEVISK, C. S.; Caracterização de bertalha (*Andrera cordifolia* (Ten.) Steenis) e ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.) e sua utilização no preparo de pães de forma. Monografia de Graduação do Curso de Nutrição. Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Porto Alegre. 2011.

MATILL, H. A.; Antioxidants. *Annu Rev Biochem* 16: 177-192. 1947.

MATSUURA, N.; ARADATE, T.; SASAKI, C.; KOJIMA, H.; OHARA, M., Screening system for the Maillard reaction inhibitor from natural products extracts. *J Health Sci.* 48: 520-526. 2002.

MEHTA, S. K.; GOWDER, S. J. T.; Members of Antioxidant Machinery and Their Functions. In *Basic Principles and Clinical Significance of Oxidative Stress*. In Tech. 2015.

MIRHOSSEINI, H.; AMID, B. T.; CHEONG, K. W.; Effect of different drying methods on chemical and molecular structure of heteropolysaccharide-protein gum from durian seed. *Food Hydrocolloids*, v. 31, n 2, p. 210-219. 2013.

MONNIER, V. M.; Intervention against the Maillard reaction in vivo. *Arch. Biochem. Biophys.* 2003.

MORAIS, D. C. M.; ALVES, V. M.; ASQUIERI, E. R.; DE SOUZA, A. R. M.; DAMIANI, C.; Physical, Chemical, nutritional and antinutritional characterization of fresh peels of yellow pitaya (*Selenicereus megalanthus*) and red pitaya (*Hylocereus costaricensis*) and their flours. *Revista Ciência Agronômica.* 2020.

MORIDI, H.; KARIMI, J.; SHEIKH, N.; GOODZARZI, M. T.; SAIDIJAM, M.; YADEGARAZARI, R.; KHAZAEI, M.; KHODADADI, I.; TAVILANI, H.; PIRI, H.; ASADI, S.; ZAREI, S.; REZAEI, A.; Resveratrol-dependent down-regulation of receptor for advanced glycation end-products and oxidative stress in kidney of rats with diabetes. *Int J Endocrinol Metab.* 13:e23542. 2015.

MORRISEY, Y. A.; O'BRIEN, J.; Nutritional and toxicological aspects of Maillard Browning reaction in foods. *Critical Reviews of Food Science and Nutrition*, v. 28, p. 211-248, 1989.

MORTON, J. F. Barbados Gooseberry. In: **Fruits of warm climates**. Miami: Creative Resource. 1987. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/newcrop/morton/barbados_gooseberry.html>. Acesso em: 28 de julho de 2022.

MULLER, M.; ANKE, M.; ILLING-GUNTHER, H.; Aluminium in foodstuffs. *Food Chemistry*, vol. 61, p. 419-428. 1998.

MUNCH, G.; KEIS, R.; WESSELS, A.; RIEDERER, P.; BAHNER, U.; HEIDLAND, A.; NIWA, T.; LEMKE, H. D.; SCHINZEL, R.; Determination of advanced glycation end products in serum by uorescence spectroscopy and competitive ELISA, *Eur. J. Clin. Chem. Clin. Biochem.* 35 (9) 669–677. 1997.

MUNIN, A.; EDWARDS-LÉVY, F., Encapsulation of natural polyphenolic compounds: a review. *Pharmaceutics.* 2011.

MUSSI, L. P.; PEREIRA, N. R., Storage stability of freeze-dried powder of jambolan (*Syzygium cumini* (L.)) fruits at different degrees of maturity and packages. *Brazilian Journal of Food Technology.* 2022.

MUTHENNA, P.; AKILESHWARI, C.; REDDY, G. B.; Ellagic acid, a new antiglycating agent: its inhibition of N ϵ -(carboxymethyl) lysine. *Biochem J.* 2012.

MUTHENNA, P.; AKILESHWARI, C.; REDDY, G. B.; Ellagic acid, a new antiglycating agente: its inhibition of N-(carboxymethyl)lysine. *Biochem J.* 442:221-30. 2012.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. *Journal of Chromatography A*, v. 1054, n. 1–2, p. 95–111, 29 out. 2004.

NEGI, J. S.; SINGH, P.; RAWAT, B. Chemical Constituents and Biological Importance of Swertia: A Review. **Current Research in Chemistry**, v. 3, n. 1, p. 1–15, 2011.

NEGRE-SALVAYRE, A.; SALVAYRE, R.; AUGÉ, N.; PAMPLONA, R.; PORTERO-OTIN, M.; Hyperglycemia and glycation in diabetic complications. *Antioxidants & redox signaling*, v. 11, n. 12, p. 3071-3109, 2009.

NENNA, A.; NAPPI, F.; AVTAAR, S. S. S.; Pharmacologic approaches against advanced glycation end products (AGEs) in diabetic cardiovascular disease, *Res. Cardiovasc. Med.*, vol. 4, nº 2, p. e26949. 2015.

OCZYPOK, E. A.; MILUTINOVIC, P. S.; ALCORN, J. F.; KHARE, A.; CRUM, L. T.; MANNI, M. L.; EPPERLY, M. W.; PAWLUK, A. M.; ANURADHA RAY, A.; OURY, T. D.; Pulmonary receptor for advanced glycation end-products promotes asthma pathogenesis through IL-33 and accumulation of group 2 innate lymphoid cells. *J. Allergy Clin. Immunol.* 136, 747. 2015.

OLIVEIRA, A. P.; NAOZUKA, J.; Iron species and proteins distribution in unconventional food plants. *Brazilian Journal of Food Technology*. 2021.

OU, J.; HUANG, J.; WANG, M.; OU, S. Effect of rosmarinic acid and carnosic acid on AGEs formation *in vitro*. *Food Chemistry*. 2017.

OUDEGEEST-SANDER, M. H.; RIKKERT, M. G. O.; SMITS, P.; The effect of an advanced glycation end-product crosslink breaker and exercise training on vascular function in older individuals: a randomized factorial design trial, *Exp. Gerontol.*, vol. 48, nº 12, pp. 1509 – 1517. 2013.

OZOUGWU, J. C.; The role of reactive oxygen species and antioxidants in oxidative stress. *International Journal*: 1. 2016.

PAMPLONA, R.; Membrane phospholipids, lipoxidative damage and molecular integrity: a casual role in aging and longevity. *Chem. Biol. Interact.* 2011.

PARTHIPAN, P.; PREETHAM, E.; MACHUCA, L. L.; RAHMAN, P. K. S. M.; MURUGAN, K.; RAJASEKAR, A.; Biosurfactant and degradative enzymes mediated crude oil degradation by Bacterium *Bacillus subtilis* A1. *Front. Microbiol.* 8 (193). 2017.

PELLEGRINI, N.; SERAFINI, M.; COLOMBI, B.; DEL RIO, D.; SALVATORE, S.; BIANCHI, M.; BRIGHENTI, F.; Total antioxidant capacity of plant foods, beverages and oils consumed in Italy assessed by three different *in vitro* assays. *The Journal of Nutrition*, 133(9), 2812–2819. 2003.

PENG, X.; MA, J.; CHEN, F.; WANG, M.; Naturally occurring inhibitors against the formation of advanced glycation end-products, *Food Funct*, vol. 2, pp. 289 – 301. 2011.

PEÑALVER, R.; MARTÍNEZ-ZAMORA, L.; LORENZO, J. M.; ROS, G.; NIETO, G.; Nutritional and Antioxidant Properties of *Moringa oleifera* Leaves in Functional Foods, 11, 1107. 2022.

PEREIRA, G. I. S.; PEREIRA, R. G. F. A.; BARCELOS, M. F. P.; MORAIS, A. R.; Avaliação química da folha de cenoura visando seu aproveitamento na alimentação humana. *Ciência e Agrotecnologia*, v. 27, n. 4, p. 852-857. 2003.

PERRONE, A.; GIOVINO, A.; BENNY, J.; MARTINELLI, F.; Advanced Glycation End Products (AGEs): Biochemistry, Signaling, Analytical Methods, and Epigenetic Effects, *Oxid Med Cell Longev.* 3818196. 2020.

PETERSON, J.; DWYER, J. Flavonoids: Dietary occurrence and biochemical activity. **Nutrition Research**, v. 18, n. 12, p. 1995–2018, 1 dez. 1998.

PIETSCH, K.; SAUL, N.; CHAKRABARTI, S.; Hormetins, antioxidants and prooxidants: defining quercetin, caffeic acid and rosmarinic acid-mediated life extension in *C. elegans*, *Biogerontology*, vol. 12, nº 4, pp. 329 – 347. 2011.

PILLAI-KASTOORI, L.; SCHUTZ-GESCHWENDER, A. R.; HARFORD, J. A.; A systematic approach to quantitative Western blot analysis, *Anal. Biochem.* 593, 113608. 2020.

PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLÜCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos.** [s.l: s.n.].

PINELO, M.; SINEIRO, J.; NÚÑEZ, M. J. Mass transfer during continuous solid-liquid extraction of antioxidants from grape byproducts. *Journal of Food Engineering*, v. 77, n. 1, p. 57-63. 2006.

PINTO, N. C. C.; MACHADO, D. C.; SILVA, J. M.; CONEGUNDES, J. L. M.; GUALBERTO, A. C. M.; GAMEIRO, J.; CHEIDER, L. M.; CASTAÑON, M. C. M.; SCIO, E., *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *Journal of Ethnopharmacology.* 173, 330-337. 2015.

POPOV, A. M.; KRIVOSHAPKO, O. N.; OSIPOV, A. N.; KOREPANOVA, E. A.; Antioxidative and membranotropic activities of rosmarinic acid, *Vopr. Pitaniya*, vol. 83, nº 3, pp. 25 – 31. 2014.

POULSEN, M. W.; HEDEGAARD, R. V.; ANDERSEN, J. M.; COURTEN, B.; BUGEL, S.; NIELSEN, J.; SKIBSTED, L. H.; DRAGSTED, L. O.; Advanced glycation endproducts in food and their effects on health. *Food Chem. Toxicol.* 2013.

PREMAKUMARA, G. A. S.; ABEYSEKERA, W. K. S. M.; RATNASOORIYA, W. D.; CHANDRASEKHARAN, N. V.; BENTOTA, A. P.; Antioxidant, anti-amylase and anti-glycation potential of brans of some Sri Lankan traditional and improved rice (*Oryza sativa L.*) varieties. *J. Cereal Sci.* 58 (3): 451-456. 2013.

PRISTOV, J. B.; MITROVIC, A.; SPASOJEVIC, I., A comparative study of antioxidant activities of cell-wall polysaccharides. *Carbohydrate Research.* 2011.

PUJARI, R. R.; VYAWAHARE, N. S.; THAKURDESAI, P. A.; Neuroprotective and antioxidant role of *Phoenix dactylifera* in permanent bilateral common carotid occlusion in rats. *J. Acute Dis.*, vol. 3, no. 2, pp. 104-114, Jan. 2014.

RABBANI, N.; ASHOUR, A.; THORNALLEY, P. J.; Mass spectrometric determination of early and advanced glycation in biology, *Glycoconj. J.* 33 (4)

553–568. 2016.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J.; Dicarbonyl proteome and genome damage in metabolic and vascular disease, *Biochem. Soc. Trans.*, vol. 24, nº 2, pp. 425 – 432. 2014.

RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J.; Dicarbonyl stress in cell and tissue dysfunction contributing to ageing and disease, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 458, pp. 221 – 226. 2015.

RABBANI, N.; XUE, M.; THORNALLEY, P. J.; Dicarbonyls and glyoxalase in disease mechanisms and clinical therapeutics. *Glycoconj J.* 33:513-25. 2016.

RAMOS, S. C.; MAGNONI, D.; CUCKIER, C.; Ferro e Ácido Fólico. 2008.

REBOREDO-RODRÍGUEZ, P. et al. Characterization of phenolic extracts from Brava extra virgin olive oils and their cytotoxic effects on MCF-7 breast cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 119, p. 73–85, 1 set. 2018.

RICE-EVANS, C. A.; DIPLOCK, A. T.; Current status of antioxidant therapy, *Free Radical Biology & Medicine* 15: 77-96. 1993.

RICHARME, G.; MIHOUB, M.; DIAROU, J.; Parkinsonism-associated Protein DJ-1/Park7 is a major protein deglycase that repairs methylglyoxal and glyoxal glycated cysteine, arginine, and lysine residues. *J. Biol. Chem.*, vol. 290, nº 3, pp. 1185 – 1197. 2015

RIEDEL, R.; MARRASSINI, C.; ANESINI, C.; GORZALCZANY, S.; Antiinflammatory and antinociceptive activity of *Urera aurantiaca*. *Phytother. Res.* 2015.

RIEHL, A.; NÉMETH, J.; ANGEL, P.; HESS, J.; The receptor RAGE: Bridging inflammation and cancer. *Cell. Commun. Signal*, 7, 12. 2009. 2013.

ROCHA, D. R. C., PEREIRA-JÚNIOR, 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**, 10 (4), 459-465, 2008.

RODRIGUES, A. S. Atividade antioxidante e antimicrobiana de extratos de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Mill.) e sua aplicação em mortadela. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul. 2016.

RODRIGUES, S. *et al*, Caracterização química e nutricional da farinha de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Mill.), p. 1-14. 2015.

ROHANI-GHANDIKOLAEI, K.; ABDULALIAN, E.; WING-KEONG, N. G.; Evaluation of the proximate, fatty acid and mineral composition of representative green, brown and red seaweeds from the Persian Gulf of Iran as potential food and feed resources. *Journal of Food Science Technology*, v. 49, n. 6, p. 774-780, 2012.

ROOHANI, N.; HURREL, R.; KELISHADI, R.; SCHULIN, R.; Zinc and its importance for human health: an integrative review. *J Res Med Sci*, 18 (2), p. 144-157. 2013.

ROSA, S. M., SOUZA, L. A. Morfo-anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). **Acta Scientiarum, Biological Science**, 25, 415-428, 2003.

RUGGERI, R. M.; BARBALACE, M. C.; CRISTANI, M. T.; ALIBRANDI, A.; GIOVINAZZO, S.; GIUFFRIDA, G.; TRIMARCHI, F.; CANNAVO, S.; CAMPENNI, A.; Serum levels of advanced glycation end products (AGEs) are increased and their soluble receptor (sRAGE) reduced in Hashimoto's thyroiditis, *J. Endocrinol. Invest.* 43 (9) 1337–1342. 2020.

RUGGERI, R. M.; VICCHIO, T. M.; CRISTANI, M.; CERTO, R.; CACCAMO, D.; ALIBRANDI, A.; GIOVINAZZO, S.; SAIJA, S.; CAMPENNI, A.; TRIMARCHI, F.; GANGEMI, S.; Oxidative Stress and Advanced Glycation End Products in Hashimoto's Thyroiditis, *Thyroid* 26 (4) 504–511. 2016.

RUSSELL, A.; LUCAS, L.; KEAST, R.; Molecular mechanisms of inflammation. Anti-inflammatory benefits of virgin olive oil and the phenolic compound oleocanthal. *Curr. Pharm. Des.* 2011.

RUST, A. N.; et al., How to transition to reduced-meat diets that benefit people and the planet. *Science of The Total Environment*, vol. 718, 137208. 2020.

SABIR, S. M.; ABBAS, S. R.; SHAHIDA, S.; KHAN, M. F.; *In-Vitro* antioxidant, anti-lipid peroxidative activities and *In-Silico* study of *Terminalia chebula* bioactive compounds. *Clin Phytosci* 6, 83. 2020.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G.; Effect of antioxidant supplementation on aging and longevity, *Biomed. Res.*, vol. 2014, pp. 1 – 17. 2014.

SADOWSKA-BARTOSZ, I.; BARTOSZ, G.; Prevention of protein glycation by natural compounds, *Molecules*, vol. 20, pp. 3309 – 3334. 2015.

SADOWSKA-BASRTOSZ, I.; GALINIAK, S.; BARTOSZ, G.; Kinetics of glycooxidation of bovine serum albumin by glucose, fructose and ribose and its prevention by food components. *Molecules.*; 19:18828-49. 2014.

SÁENZ, C.; SEPÚLVEDA, E.; MATSUHIRO, B., *Opuntia spp* mucilage's: a functional component with industrial perspectives. *Journal of Arid Environments*, v. 57, p. 275-290. 2004.

SAFDAR, M. N. *et al*, Extractio and qualification of polyphenols from kinnow (*Citrus reticulata* L.) peel using ultrasound and maceration techniques. *Journal of Food and Drug Analysis*. 2017.

SAITO, M.; MARUMO, K.; FUJII, K.; ISHIOKA, N.; Single-column high-performance liquid chromatographic- uorescence detection of immature, mature, and senescent cross-links of collagen, *Anal. Biochem.* 253 (1) 26–32. 1997.

SAKHAROV, I. Y.; DEMIYANOVA, A. S.; GRIBAS, A. V.; USKOVA, N. A.; EFREMOV, E. E.; VDOVENKO, M. M. 3-(10'-Phenothiazinyl)propionic acid is a potent primary enhancer of peroxidase-induced chemiluminescence and its application in sensitive ELISA of methylglyoxal-modified low density lipoprotein, *Talanta*. 115 414–417. 2013.

SANTANA, C. S. *et al.*, Desenvolvimento de Suplemento Alimentar Utilizando Ora-pro-nóbis. *Cadernos de Agroecologia*, v. 13, n. 2, p. 1-10. 2018.

SANTOS, M. R.; *Cacti: Ecology, Conservation, Uses and Significance*. Nova Science Publishers. 2019.

SCHAIC, K. M.; Co-oxidants of oxidizing lipids: reactions with proteins. In A. Kamal-Eldin, & D. Min (Eds.), *Lipid Oxidation Pathways*, vol. 2, p. 183-274. AOCS Press.

SCHEIJEN, J. L.; VAN DE WAARENBURG, M. P.; STEHOUWER, C. D.; SCHALKWIJK, C. G.; Measurement of pentosidine in human plasma protein by a single-column high-performance liquid chromatography method with uorescence detection, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 877 (7) 610–614. 2009.

SCHIANTARELLI, P.; CADEL, S.; ACERBI, D.; PAVESI, L.; Antiinflammatory activity and bioavailability of percutaneous piroxican. *Drug. Res.* 32, 230-235. 1982.

SCHIEFERDECKER, M. E. M.; THIEME, R. D.; HAUSCHILD, D. B.; Vitaminas, minerais e eletrólitos: aspectos fisiológicos, nutricionais e dietéticos. Ed Rubio. 2015.

SCOTT, W. J.; Water relations of food spoilage microorganisms. *In Advances in food research*. Academic press, vol 7, pp 83-127. 1957.

SEMBA, R. D.; BANDINELLI, S.; SUN, K.; GURNALIK, J. M.; FERRUCCI, L.; Relationship of an advanced glycation end product, plasma carboxymethyl-lysine, with slow walking speed in older adults: the InCHIANTI study. *Eur. J. Appl. Physiol.* 108, 191. 2010.

SERGIEV, P. V.; DONTSOVA, O. A.; BEREZKIN, G. V.; Theories of aging: timeless topic, *Acta Nat.*, vol 7, n° 1 (24), pp. 9 – 20. 2015.

SHAHIDI, F. Antioxidants: Principles and applications. **Handbook of Antioxidants for food preservation**, p. 1 – 14, 1 jan. 2015.

SHAHIDI, F.; JANITHA, P K.; WANASUNDARA, P. D. Phenolic Antioxidants. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, 1992.

SHAHIDI, F.; NACZK, M. **Phenolics in food and nutraceuticals**. [s. l: s. n.].

SHAMIHA, N. N. N. D.; SHUKRIYAH, S. S.; RYUICHIRO, S.; YOSHIKI, S.; JIYAUDDIN, K.; IMBRAHIM, A.; NIZAM, M. A. G.; FADLI, A. M.; EDDY, Y.; **Study on Biological Active Componentes of Eurycoma Longifolia**. *School of*

Pharmacy, Management and Science University. Malasya. 2021.

SHARMA, G. N.; DUBEY, S. K.; SATI, N.; SANADYA, J.; Evaluation of wound healing activity of *Aegle marmelos* seeds. *Pharmacologyonline*. 2: 171-178. 2011.

SHAW, S. S.; SCHMIDT, A. M.; BANES, A. K.; WANG, X.; STERN, D. M.; MARRERO, M. B.; S100-RAGE-mediated augmentation of angostensis II-induced activation of JAK2 in vascular smooth muscle cells is dependent on PLD2. 52, 2381. 2003.

SHIMOJO, Y.; KOSAKA, K.; NODA, Y.; Effect of rosmarinic acid in motor dysfunction and life span in a mouse model of familial amyotrophic lateral sclerosis, *J. Neurosci. Res.*, vol. 88, nº 4, pp. 896 – 904. 2010.

SHIN, S.; LEE, J.; KIM, M.; KUM, H.; JUNG, E.; PARK, D.; Anti-Glycation Activities of Phenolic Constituents from *Silybum marianum* (Milk Thistle) Flower *in Vitro* and on Human Explants. *Molecules*. ISSN 1420-3049. 2015.

SIERAKOWSKI, M. R., Alguns aspectos químicos, físico-químicos e estruturais da mucilagem extraída de folhas de *Pereskia aculeata* Mill., Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 1982.

SIERAKOWSKI, M. R., Aspectos estruturais da mucilagem de *Pereskia aculeata* Mill. (ora-pro-nóbis). Tese (Doutorado em Bioquímica) – Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná. 1988.

SIERAKOWSKI, M. R.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C., Location of O-acetyl groups in the heteropolysaccharide of the cactus *Pereskia aculeata*. *Carbohydrate Research*, p. 277-284. 1990.

SIERAKOWSKI, M. R.; GORIN, P. A. J.; REICHER, F.; CORRÊA, J. B. C., Some structural features of a heteropolysaccharide from the leaves of the cactus *Pereskia acuelata*. *Phytochemistry*, v. 26, p. 1709-1713. 1987.

SILVA, A. M. N.; BORRALHO, A. C.; PINHO, S. A.; DOMINGUES, M. R. M.; DOMINGUES, P.; Cross-oxidation of Angiotensin II by glycerophosphatidylcholine oxidation products. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* 2011.

SILVA, D. S., AGOSTINI-COSTA, T. S., SILVA, J. P., VIEIRA, R. F., GOMES, I. S., Caracterização química e conservação de germoplasma de ora-pro-nóbis (*Pereskia grandifolia* haw. e *P. aculeata* mil.) na Embrapa. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE RECURSOS GENÉTICOS, 2., Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2012. 1 CD ROM. 2012.

SILVA, L. R.; FIGUEIREDO, A. R.; OLIVEIRA, M. M. T.; MORGADO, C. M. A.; RIMOLI, P. A. R.; MORAIS, L. A. S.; Biochemical composition and biological potential of ora-pro-nobis fruit: an overview. *Revista de Agricultura Neotropical, Cassilândia – MS*, v. 10, n. 1. 2023.

SILVA, L. W.; Potencial tecnológico da folha da *Pereskia aculeata* Miller (ora-pro-nóbis): Uma Revisão. Universidade Federal de Santa Catarina. Departamento de Engenharia Química e Engenharia de Alimentos. 2019.

SILVA, M. C.; ROCHA, C. R.; SILVA, T. M. R.; PINTO, N. A. V. D.; Teores de proteínas e fibras de taioba, ora-pro-nobis, serralha e mostarda coletadas no município de Diamantina. Fundação Educacional Científica e Tecnologia da UFVJA, 8, Diamantina, MG, p 124. 2006.

SILVAN, J. M.; ASSAR, S. H.; SREY, C.; DEL CASTILLO, M. D.; AMES, J. M.; Controlo f the Maillard reaction by ferulic acid. Food Chem. 128:208-13. 2011.

SINGH, N.; NIYOGI, R. G.; MISHRA, D.; SHARMA, M.; SINGH, D.; Antioxidants in oral health and diseases: future prospects. IOSR Journal of Dental and Medical Sciences 10: 36-44. 2013.

SINGHAL, N.; KUMAR, M.; KANAUIA, P. K.; VIRDI, J. S.; MALDI-TOF mass spectrometry: an emerging technology for microbial identification and diagnosis. Front. Microbiol., sec antimicrobials, resistance and chemotherapy. Vol 6. 2015.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A.; JR, J. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. American Journal of Enology and Viticulture, 16 (3), p. 144-158. 1965.

SOBRINHO, S. S. *et al.*, Emulsified cooked sausages enriched with flour from ora-pro-nóbis leaves (*Pereskia aculeata* Miller). International Food Research Journal, v. 22, n. 1, p. 318-323. 2015.

SOHAIL, I.; ARIF, M.; RAUF, M.; RIZWAN, A.; ALI, M.; SAQIB, S.; ZIA-UR-REHMAN, M.; Organic manures for cadmium tolerance and remediation. Cadmium Tolerance in Plants. Elsevier, p. 19-67. 2019.

SOUZA, M. C. D.; SARTOR, C. F.; FELIPE, D. F.; Comparação da ação antioxidante de uma formulação contendo extrato de *Pereskia aculeata* com cosméticos anti-idade presentes no mercado. Revista Saúde e Pesquisa, v. 6, n. 3, p. 461-477. 2013.

SPACEK, P.; ADAM, M.; HPLC method for pentosidine determination in urine, serum, and tissues as a marker of glycation and oxidation loading of the organism, *J Liq Chrom Rel Technol* 25 (12) 1807–1820. 2002.

SRIKANTH, V.; MACZUREK, A.; PHAN, T.; STEELE M.; WESTCOTT, B.; JUSKIW, D.; MUNCH, G.; Advanced glycation endproducts and their receptor RAGE in Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging*. 32, 763. 2011.

STANLEY, P induced by multiple topical applications of 12-O-tetradecanoylphorbol-13-acetate. *Skin Pharmacol*. 4, 262-271. 1991.

STROZECKI, P.; KUROWSKI, R.; FLISINSKI, M.; STEFANSKA, A.; ODROWAZ-SYPNIEWSKA, G.; MANITIUS, J.; Advanced glycation end products and arterial stiffness in patients with diabetic nephropathy and patients with chronic kidney disease without diabetes, *Pol. Arch. Med. Wewn*. 123 (11) 609–616. 2013.

SWERGOLD, B. S.; Maillard reactions in hyperthermophilic archaea: implications for better understanding of non-enzymatic glycation in biology, *Rejuvenation Res.*, vol. 16, nº 4, pp. 259 – 272. 2013.

TALEB, H.; MADDOCKS, S. E.; MORRIS, R. K.; KANEKANIAN, A. D.; Chemical characterisation and the anti-inflammatory, anti-angiogenic and antibacterial properties of date fruit (*Phoenix dactylifera* L.). *J. Ethnopharmacol.*, vol. 194, no. May, pp. 457-468, 2016.

TAMES, F. J.; MACKNESS, M. I.; ARROL, S.; LAING, I.; DURRINGTON, P. N.; Non-enzymatic glycation of apolipoprotein B in the sera of diabetic and non-diabetic subjects. *Atherosclerosis*, v. 93, p. 237-244, 1992.

TAREKE, E.; FORSLUND, A.; LINDH, C. D.; FAHLGREN, C.; ÖSTMAN, E.; Isotope dilution ESI-LC-MS/MS for quantification of free and total N ϵ -(1-Carboxymethyl)-L-Lysine and free N ϵ -(1-Carboxyethyl)-L-Lysine: comparison of total N ϵ -(1-Carboxymethyl)-L-Lysine levels measured with new method to ELISA assay in gruel samples. *Food Chem.* 141:4253–9. 2013.

TELLES, C. C., MATOS, J. M. M., MADEIRA, N. R., MENDONÇA, J. L., BOTREL, N., JUNQUEIRA, A. M. R., SILVA, D. B., ***Pereskia aculeata: ora-pro-nobis***. In: VIEIRA, R. F., CAMILLO, J., CORADIN, L. (Ed.). **Espécies nativas da flora brasileira de valor econômico atual ou potencial: plantas para o futuro: Região Centro-Oeste**. Brasília, DF: MMA. (Série Biodiversidade; 44). p. 319-323., 2016.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; PARK, K. J.; Nutritive evaluation of non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Mill.). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, v. 60, n. 1, p. 148-160. 2009.

TEIXEIRA, I. R.; SOUZA, C. M.; BORÉM, A.; SILVA, G. F.; Variação dos valores de pH e dos teores de carbono orgânico, cobre, manganês, zinco e ferro em profundidade em Argissolo Vermelho-Amarelo, sob diferentes sistemas de preparo do solo. *Bragantia*, v. 62, p. 119-126. 2003.

TENKERIAN, C.; EL-SIBAI, M.; DAHER, C. F.; MROUEH, M.; Hepatoprotective, Antioxidant, and Anticancer Effects of the *Tragopon porrifolius* Methanolic Extract. *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.*, vol. 2015, 2015.

THESSIER, F. J.; The Maillard reaction in the human body. The main discoveries and factors that affect glycation. *Pathol. Biol.* 58, 214. 2010.

THORNALLEY, P. J.; RABBANI, N.; Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry—a user’s perspective, *BBA* 1840 (2) 818–829. 2014.

THORNALLEY, P. J.; RABBANI, N.; Detection of oxidized and glycated proteins in clinical samples using mass spectrometry – a user’s perspective. *Biochim. Biophys. Acta.* 1840, 818. 2014.

TOFANELLI, M. B. D., RESENDE, S. G. Sistemas de condução na produção de

folhas de ora-pro-nobis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, 41 (3), 466-469, 2011.

TOMINAGA, Y.; SUGAWA, H.; HIRABAYASHI, K.; IKEDA, T.; HOSHI, Y.; RYOJI, N.; *Drosera tokaiensis* extract containing multiple phenolic compounds inhibits the formation of advanced glycation end-products. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 693 108585. 2020.

TORMA, A. F.; GROVES, K.; BIESENBRUCH, S.; MUSSELL, C.; REID, A.; ELLISON, S.; CRAMER, R.; QUAGLIA, M.; A candidate liquid chromatography mass spectrometry reference method for the quantification of the cardiac marker 1–32 B-type natriuretic peptide, *Clin. Chem. Lab. Med.* 55 (9) 1397–1406. 2017.

UEDA, K. M., Extração de compostos fenólicos provenientes das folhas de uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) empregando solventes eutéticos profundos (DES). 2020.

URIBARRI, J.; CASTILLO, M. D.; MAZA, M. P.; FILIP, R.; GUGLIUCCI, A.; LUEVANO-CONTRERAS, C.; MACÍAS-CERVANTES, M. H.; BASTOS, D. H.; MEDRANO, A.; MENINI, T.; PORTERO-OTIN, M.; ROJAS, A.; SAMPAIO, G. R.; WROBEL, K.; GARAY-SEVILLA, M. E.; Dietary Advanced Glycation End Products and Their Role in Health and Disease. *Adv. Nutr.* 40, 419. 2015.

URIBARRI, J.; WOODRUFF, S.; GOODMAN, S.; CAI, W.; CHEN, X.; PYZIK, R.; YONG, A.; STRIKER, G. E.; VLASSARA, H. J.; Advanced glycation end products in foods and a practical guide to their reduction in the diet., *J. Am. Diet. Assoc.*, 110, 911. 2010.

UUSIKU, N. P.; OELOFSE, A.; DUODU, K. G.; BESTER, M.; FABER, M.; Nutritional value of leafy vegetables of sub-Saharan Africa and their potential contribution to human health: A review. *Journal Food Composition and Analysis*, v. 23, p. 499-509. 2010.

VAN SCHAFTINGEN, E.; COLLARD, F.; WIAME, E.; VEIGA-DA-CUNHA, M.; Enzymatic repair of Amadori products, *Amino Acids*, vol 42, pp. 1143 – 1150. 2012.

VARGAS, A. G. DE; DA ROCHA, R. D. C.; TEIXEIRA, S. D. Influência da sazonalidade na composição centesimal da *Pereskia aculeata* Miller. *Synergismus scyentifica UTFPR*, v. 12, n. 1, p. 1-7. 2017.

VASARRI, M.; BARLETTA, E.; RAMAZZOTTI, M.; DEGL'INNOCENTI, D.; *In vitro* anti-glycation activity of the marine plant *Posidonia oceanica* (L.) *Delile*. *Journal of Ethnopharmacology*. 2020.

VISTOLI, G.; MADDIS, D.; CIPAK, A.; ZARKOVIC, N.; CARINI, M.; ALDINI, G.; Advanced glycoxidation and lipoxidation and products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation. *Free Radical Res.* 2013.

VLASSARA, H.; STRIKER, G. E.; Glycotoxins in the diet promote diabetes and diabetic complications. *Curr. Diabetes Rep.*, 7, 526, *Nat. Rev. Endocrinol.* 2001.

VLISSARA, H.; URIBARRI, J.; Advanced glycation end product (AGE) and diabetes: cause, effect, or both? *Curr. Diabetes Rep.* 14, 453. 2014.

WANG, P.; CHEN, H.; SANG, S.; Trapping methylglyoxal by genistein and its metabolites in mice. *Chem Res Toxicol.* 29:406-14. 2016.

WANG, X.; ZHANG, L.; DONG, L.; Inhibitory effect of polysaccharides from pumpkin on advanced glycation end-products formation and aldose reductase activity. *Food Chemistry.* 2011.

WATZL, B. Anti-inflammatory effects of plant-based foods and of their constituents. *Int. J. Vitam. Nutr. Res.* 2008.

WAUTIER, M. P.; CHAPPEY, O.; CORDA, S.; STERN, D. M.; SCHMIDT, A. M.; WAUTIER, J. L.; Activation of NADPH oxidase by AGE links oxidant stress to altered gene expression via RAGE. *American Journal of Physiology and Metabolism*, v. 280, p. E685-694, 2001.

WEGGLER, K.; MCLAUGHLIN, M. J.; GRAHAM, R. D.; Effect of chloride in soil solution on the plant availability of biosolid-borne cadmium. *J. Environ. Qual.* 33, p. 496-504. 2004.

WEI, B.; BERNING, K.; QUAN, C.; ZHANG, Y. T.; Glycation of antibodies: Modification, methods and potential effects on biological functions, *MAbs* 9 (4) 586–594. 2017.

WEI, Y.; CHEN, L.; CHEN, J.; GE, L.; HE, R. Q.; Rapid glycation with D-ribose induces globular amyloid-like aggregations of BSA with high cytotoxicity to SH-SY5Y cells. *BMC Cell Biology.* 2009.

WHITCOM, E. A.; CHIU, C. J.; TAYLOR, A.; Dietary glycemia as a determinant of health and longevity, *Mol. Aspects Med.*, vol. 46, p. 14. 2015

WIJETUNGE, D. C. R.; PERERA, H. K. I.; A novel in vitro method to identify protein glycation inhibitors. *Asian Journal of Medical Sciences*, vol. 3. 2014.

WILKER, S. C.; CHELLAN, P.; ARNOLD, B. M.; NAGARAJ, R. H.; Chromatographic quantification of argpyrimidine, a methylglyoxal-derived product in tissue proteins: comparison with pentosidine, *Anal. Biochem.* 290 (2) 353–358. 2001.

WILLEMANS, S.; HARTOG, J. W.; HUMMEL, Y. M.; Effects of alagebrium, an advanced glycation end-product breaker, in patients with chronic heart failure: study design and baseline characteristics of the BENEFICIAL trial, *Eur. J. Heart Failure*, vol. 12, no 3, pp. 294-300. 2010.

WOLF, G.; The discovery of the antioxidant function of vitamin E: The contribution of Henry A. Mattill. *J Nutr* 135: 363-366. 2005.

WU, C. H.; YE, C. T.; SHIH, P. H.; YEN, G. C.; Dietary phenolic acids attenuate multiple stages of protein glycation and high-glucose-stimulated proinflammatory IL-1 β activation by interfering with chromatin remodeling and transcription in

- monocytes. *Mol Nutr Food Res.*; 54 (Suppl 2): S127-40. 2010.
- WU, C. H.; YEN, G. C.; Inhibitory effect of naturally occurring flavonoids on the formation of advanced glycation endproducts. *J Agric Food Chem.* 53:3167-73. 2005.
- WUANA, R. A.; OKIEMEN, F. E.; Heavy metals in contaminated soils a review of sources, chemistry, risks and best available strategies for remediation. *Commun. Soil Sci. Plant Anal.* 42, p. 111-122. 2011.
- XI, M.; HAI, C.; TANG, H.; CHEN, M.; FANG, K.; LIANG, X.; Antioxidant and antiglycation properties of total saponins extracted from traditional Chinese medicine used to treat diabetes mellitus. *Phytother Res.* 2008.
- XIAO, F.; XU, T.; LU, B.; LIU, R.; Guidelines for antioxidant assays for food components. *Food Frontiers.* 2020.
- XIE, Y.; CHEN, X.; Structures required of polyphenols for inhibiting advanced glycation end products formation, *Curr. Drug Metab.*, vol. 14, no 4, pp. 414-431. 2013.
- XUE, M.; WEICKERT, M. O.; QURESHI, S.; KANDALA, N. B.; ANWAR A.; WALDRON, M.; SHAFIE, A.; MESSENGER, D.; FOWLER, M.; JENKINS, G.; RABBANI, N.; THORNALLEY, P. J.; Improved Glycemic Control and Vascular Function in Overweight and obese subjects by glyoxalase 1 inducer formulation. *Diabetes.* 65:2282-94. 2016.
- YAKHLEF, W. et al. Phenolic composition and antimicrobial activity of Algerian olive products and by-products. *LWT*, v. 93, p. 323–328, 1 jul. 2018.
- YAMAGISHI, S.; Potential clinical utility of advanced glycation end product cross-link breakers in age and diabetes associated disorders, *Rejuvenation Res.*, vol. 15, no 6, pp. 564-572. 2012.
- YAMAGISHI, S.; Role of advanced glycation end products (AGEs) and receptor for AGEs (RAGE) in vascular damage in diabetes. *S. Exp. Gerontol.* 2011.
- YAN, L. J.; Pathogenesis of chronic hyperglycemia: from reductive stress to oxidative stress, *J. Diabetes Res.*, pp. 1-11. 2014.
- YAN, X. Short-Chain Polyssaccharide Analysis in Ethanol-Water Solutions. *Journal of AOAC International*, vol. 100, n. 4. 2017.
- YATES, J. R.; Mass spectrometry and the age of the proteome, *J. Mass Spectrom.* 33, 1-19. 1998.
- YELTSIN, Y.; Glycation, Antiglycation and Deglycation: Their Role in Aging Mechanisms and Geroprotective Effects (Literature Review). *Advances In Gerontology*, vol. 7, nº 1, pp. 1-9. Ural Federal University, Russia. 2017.
- ZAPPI, D., TAYLOR, N. **Cactaceae in Flora do Brasil 2020 em construção.** Jardim Botânico do Rio de Janeiro. Disponível em:

<<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/reflora/floradobrasil/FB1632>>. Acesso em: 28 de julho de 2022.

ZHANG, F.; TANG, Y.; YANG, X.; PAN, Y.; HOU, Q.; DING, Y.; PEI, J.; Anti-lipid oxidation of chitosan oligosaccharide modified by laccase/TEMPO reaction. *Polymer*, 246, 124742. 2022.

ZHANG, H.; WANG, L.; DEROLE, S.; BENNETT, R.; DAVIES, K. New Insight into the Structures and Formation of Anthocyanic Vacuolar Inclusions in Flower Petals. **BMC Plant Biology**, 6, 29. 2006.

ZHANG, Q.; AMES, J. M.; SMITH, R. D.; BAYNES, J. W.; METZ, T. O.; A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *Proteome Res.* 2009.

ZHANG, Q.; MONROE, M. E.; SCHEPMOES, A. A.; CLAUSS, T. R. W.; GRITSENKO, M. A.; MENG, D.; Comprehensive identification of glycated peptides and their glycation motifs in plasma and erythrocytes of control and diabetic subjects. *J Proteome Res.*10:3076–88. 2011.

ZHANG, Q.; MONROE, M. E.; SCHEPMOES, A. A.; CLAUSS, T. R.; GRITSENKO, M. A.; MENG, D.; PETYUK, V. A.; SMITH, R. D.; METZ, T. O.; Comprehensive identification of glycated peptides and their glycation motifs in plasma and erythrocytes of control and diabetic subjects, *J. Proteome Res.* 10 (7) 3076–3088. 2011.

ZHANG, Q.; TU, Z.; WANG, H.; FAN, L.; HUANG, X.; XIAO, H. A high throughput screening assay for identifying glycation inhibitors on MALDI-TOF target. *Food Chemistry*, p. 160-168. 2015.

ZHANG, Q. W.; LIN, L. G.; YE, W. C., Techniques for extraction and isolation of natural products: A comprehensive review. *Chinese Medicine (United Kingdom)*, v. 13, n. 1, p. 1-26. 2018.

ZHENG, X. K. *et al.* Phenolic constituents from the root bark of *Morus alba* L. and their cardioprotective activity in vitro. **Phytochemistry**, v. 135, p. 128 – 134, 1 mar. 2017.

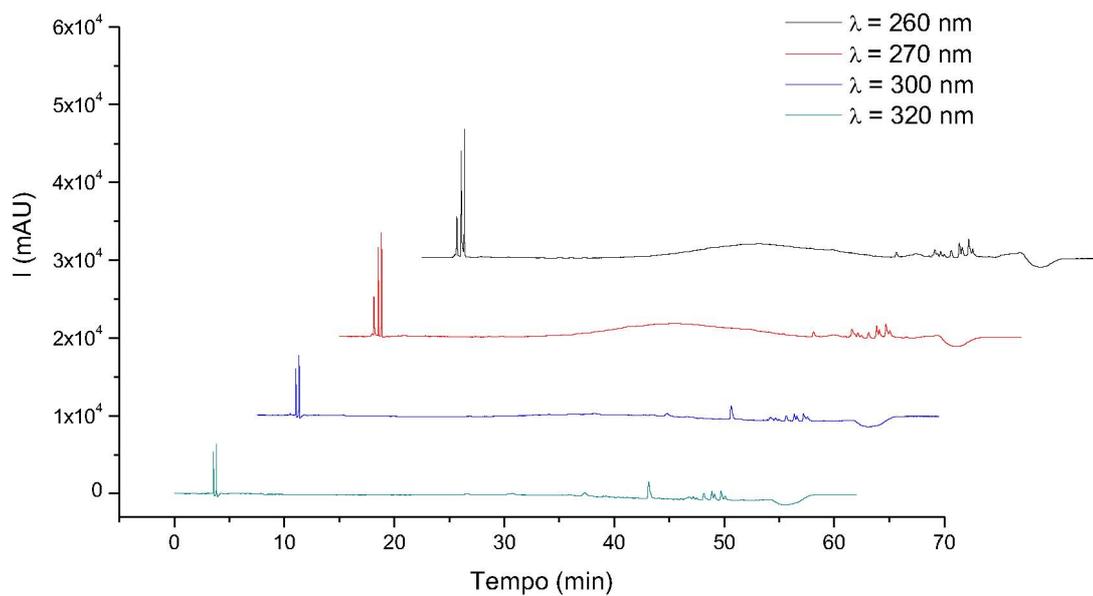
ZHISHEN, J.; MENGCHENG, T.; JIANMING, W.; The determination of flavonoid contents in mulberry and their scavenging effects on superoxide radicals. *Food Chemistry*, v. 64, n. 4, p. 555-559. 1999.

ZHONG, J. J.; XIAO, J. H. Secondary metabolites from higher fungi: discovery, bioactivity, and bioproduction. **Advances in biochemical engineering/biotechnology**, v. 113, p. 79–150, 2009.

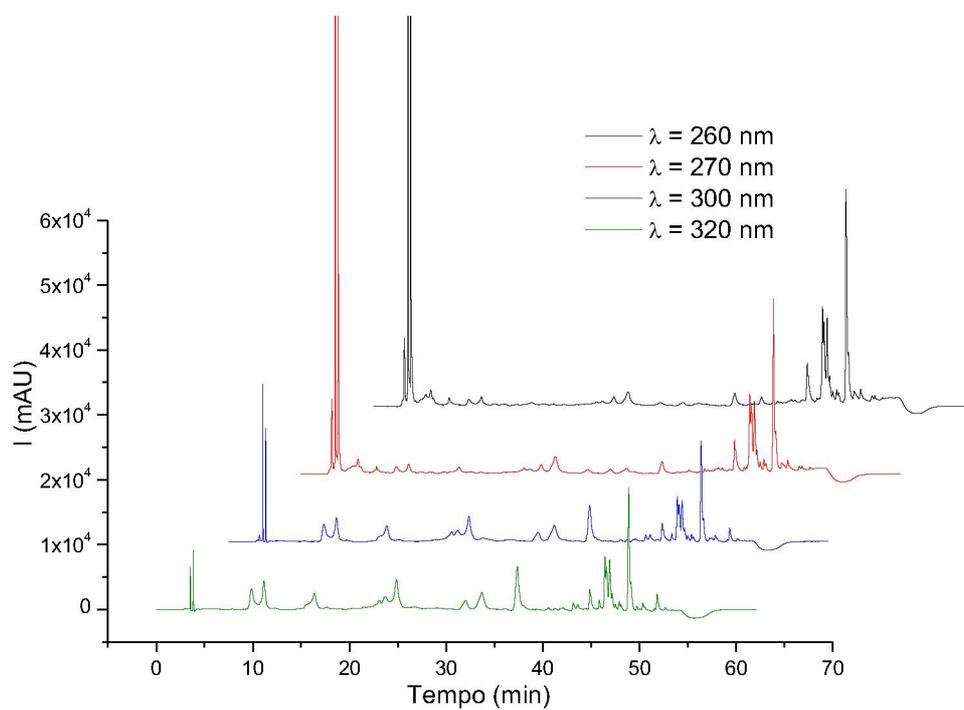
ZIEMAN, S.; KASS, D.; Advanced glycation end product crosslinking: pathophysiologic role and therapeutic target in cardiovascular disease. *Congest Heart Fail.* 10:144-9; quiz 150-1. 2004.

ANEXO 1 – CROMATOGRAMA 1 HPLC-DAD ÁCIDOS FENÓLICOS

1. EXTRATO FRUTOS

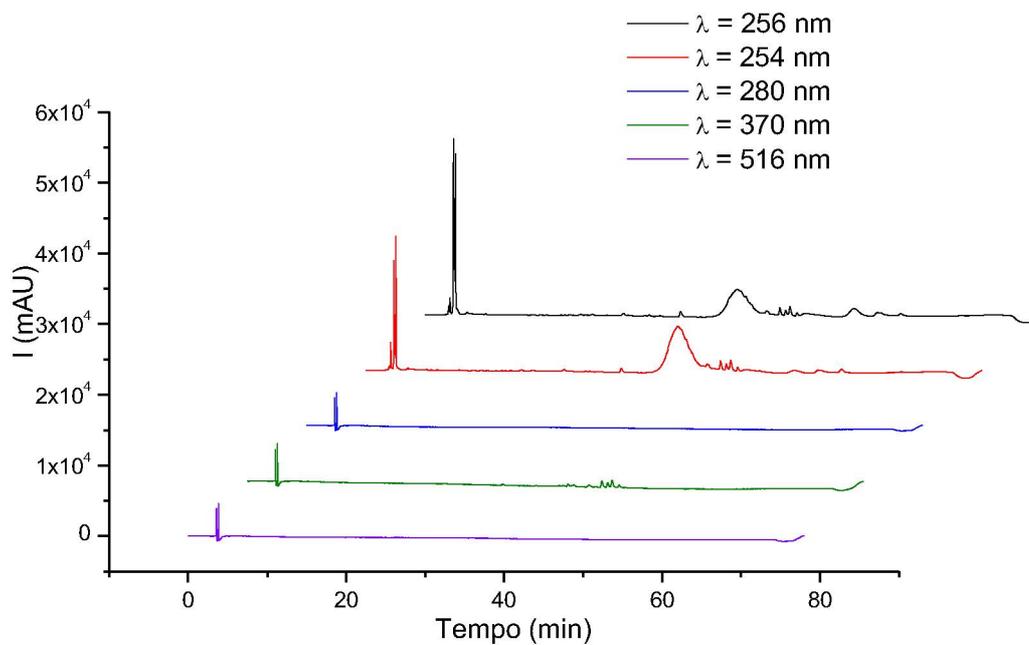


2. EXTRATO FOLHAS

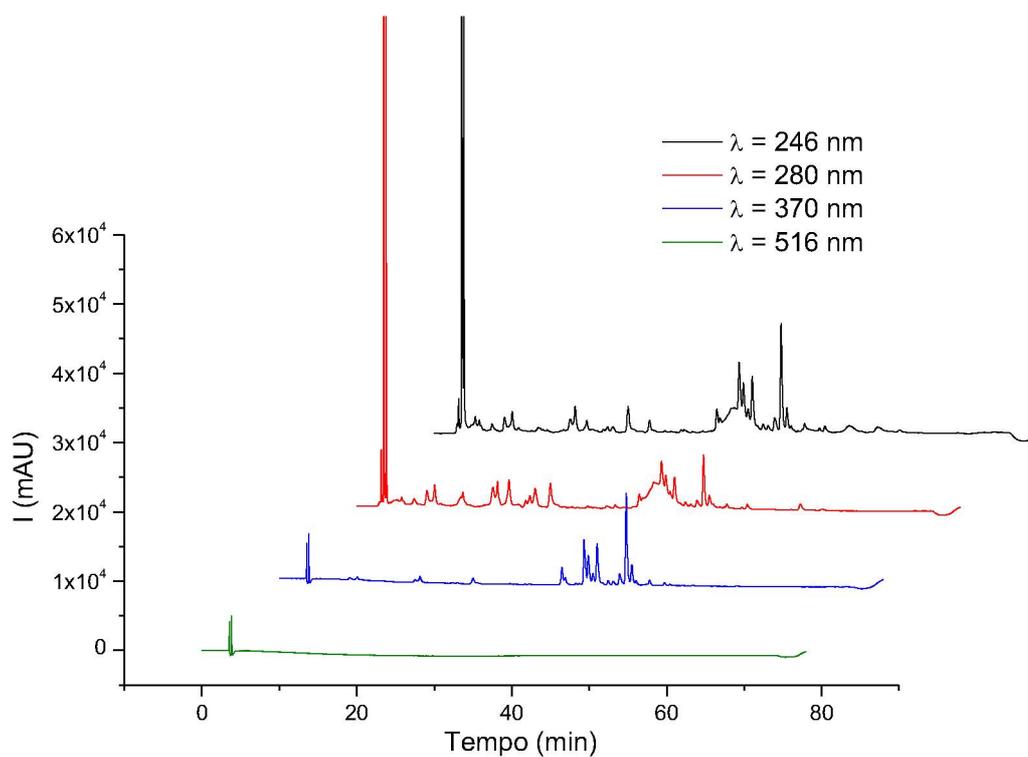


ANEXO 2 – CROMATOGRAMA 2 HPLC-DAD FLAVONOIDES

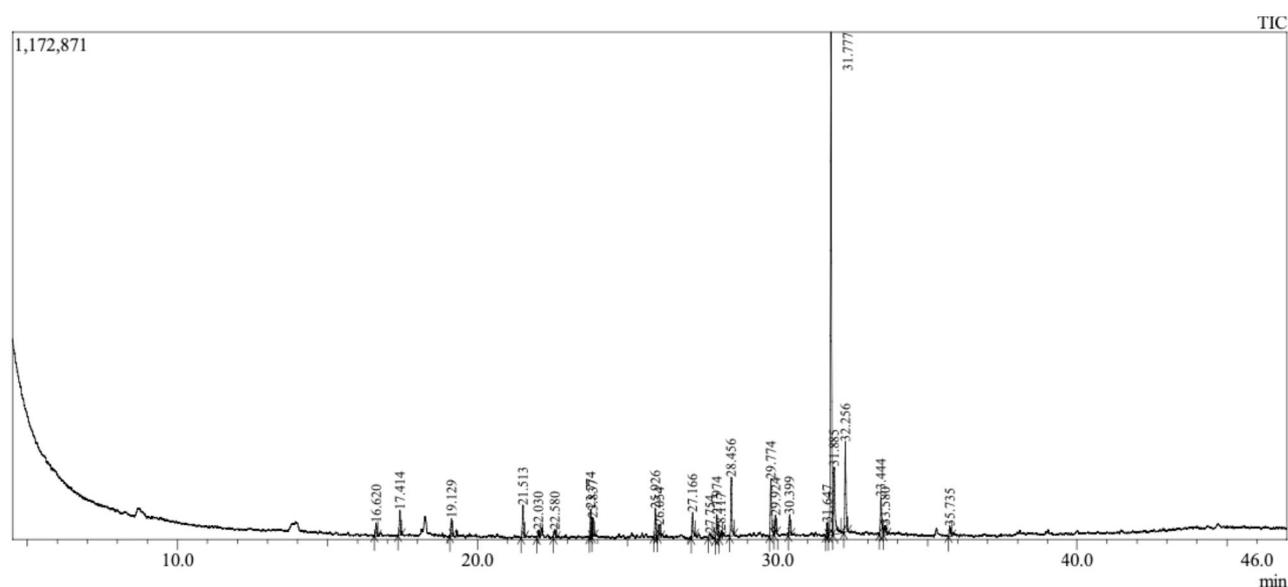
1. EXTRATO FRUTOS



2. EXTRATO FOLHAS

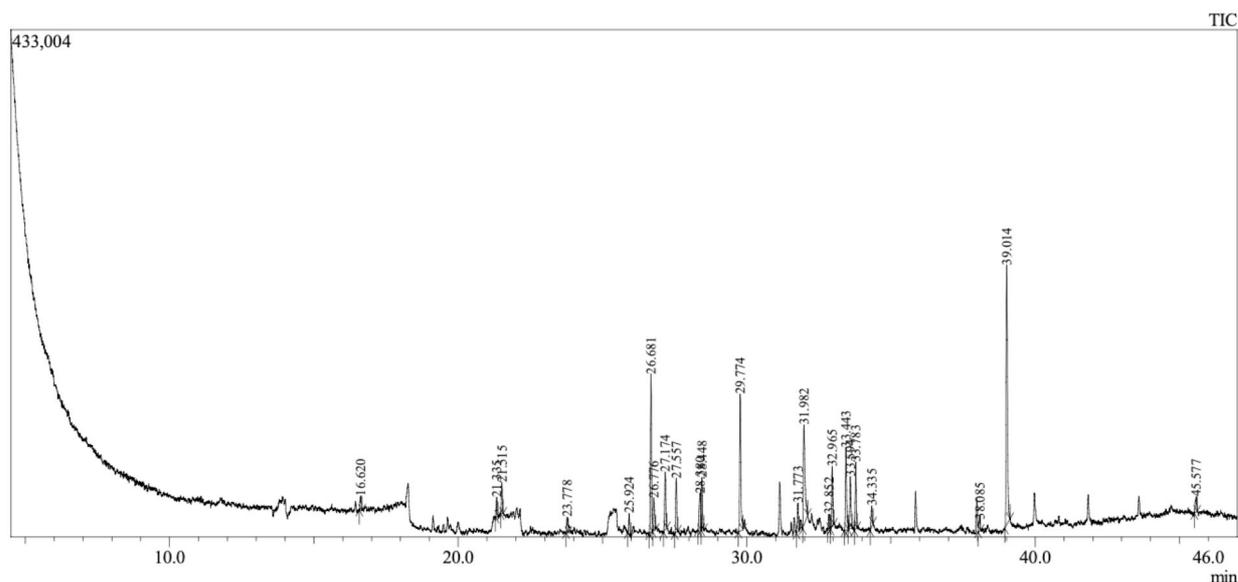


ANEXO 3 – CROMATOGRAMA GC-MS EXTRATO FRUTOS



Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	16.620	16.560	16.680	89418	1.23	29731	1.13	3.01		Pentadecane
2	17.414	17.355	17.465	165590	2.28	57782	2.19	2.87		Nonanoic acid, 9-oxo-, methyl ester
3	19.129	19.075	19.175	101594	1.40	40655	1.54	2.50		Heptacosane
4	21.513	21.455	21.575	196103	2.70	74893	2.84	2.62		Heptacosane
5	22.030	21.970	22.080	57976	0.80	17852	0.68	3.25		2,5-Cyclohexadien-1-one, 2,6-bis(1,1-dimethyl-)
6	22.580	22.525	22.630	70965	0.98	19105	0.73	3.71	V	Tricosane
7	23.774	23.725	23.805	168049	2.31	64366	2.44	2.61	V	Heptacosane
8	23.837	23.805	23.895	152263	2.09	43349	1.65	3.51	V	2,6,10-Trimethyltridecane
9	25.926	25.875	25.980	164341	2.26	68029	2.58	2.42		Heptacosane
10	26.054	25.995	26.120	112925	1.55	28595	1.09	3.95		2,6,10-Trimethyltridecane
11	27.166	27.120	27.245	152616	2.10	57086	2.17	2.67	V	1,2-Benzenedicarboxylic acid, bis(2-methyl-)
12	27.754	27.690	27.825	50529	0.69	10644	0.40	4.75		2-Methylhexacosane
13	27.974	27.915	28.050	160831	2.21	56949	2.16	2.82		Eicosane
14	28.117	28.050	28.150	51400	0.71	16993	0.65	3.02	V	7,9-Di-tert-butyl-1-oxaspiro(4,5)deca-6,9-di
15	28.456	28.400	28.555	361370	4.97	136038	5.17	2.66		Hexadecanoic acid, methyl ester
16	29.774	29.720	29.870	364039	5.01	131038	4.98	2.78		Hexadecanoic acid, ethyl ester
17	29.924	29.870	29.970	102577	1.41	42371	1.61	2.42	V	Eicosane
18	30.399	30.360	30.455	117893	1.62	47058	1.79	2.51	V	Methyl stearate
19	31.647	31.605	31.690	81981	1.13	30805	1.17	2.66		9,12-Octadecadienoic acid, methyl ester
20	31.777	31.690	31.840	2979738	40.98	1162360	44.15	2.56	V	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-
21	31.885	31.840	32.115	590142	8.12	156178	5.93	3.78	SV	9-Octadecenoic acid, methyl ester, (E)-
22	32.256	32.205	32.340	553443	7.61	209705	7.96	2.64		Methyl stearate
23	33.444	33.390	33.525	263388	3.62	86403	3.28	3.05	V	Octadecanoic acid, ethyl ester
24	33.580	33.525	33.650	84136	1.16	21194	0.80	3.97	V	Triacotane, 1-iodo-
25	35.735	35.690	35.810	78335	1.08	23682	0.90	3.31		Methyl 18-methylnonadecanoate
				7271642	100.00	2632861	100.00			

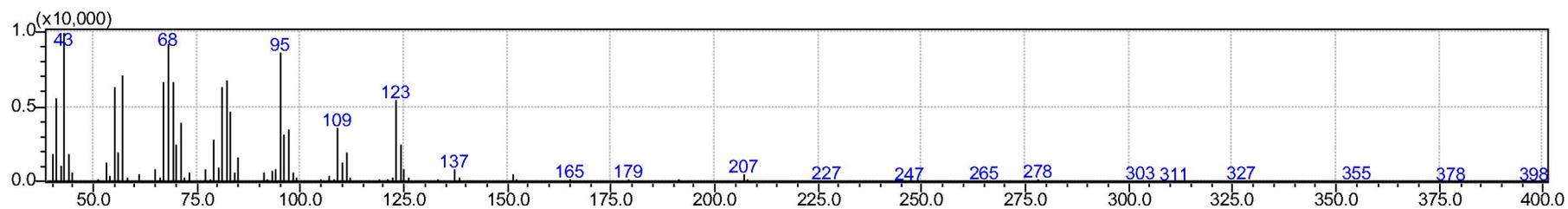
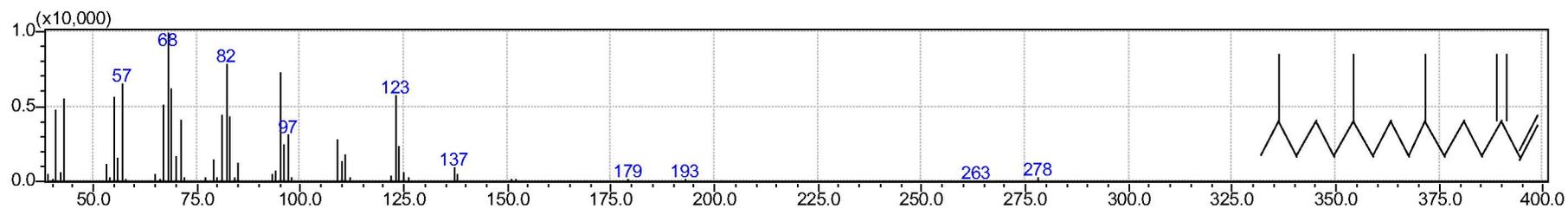
ANEXO 4 – CROMATOGRAMA GC-MS EXTRATO FOLHAS



Peak Report TIC										
Peak#	R.Time	I.Time	F.Time	Area	Area%	Height	Height%	A/H	Mark	Name
1	16.620	16.575	16.675	36874	1.11	12124	1.06	3.04		Tetradecane
2	21.335	21.290	21.385	36294	1.09	16588	1.45	2.19		Octadecanoic acid, ethyl ester
3	21.515	21.470	21.560	59810	1.79	26780	2.34	2.23		Heptadecane
4	23.778	23.735	23.815	34813	1.04	13173	1.15	2.64		Heneicosane
5	25.924	25.880	25.980	45373	1.36	17780	1.55	2.55		Heneicosane
6	26.681	26.620	26.735	351334	10.54	135460	11.82	2.59		Neophytadiene
7	26.776	26.735	26.850	91393	2.74	28230	2.46	3.24	V	2-Pentadecanone, 6,10,14-trimethyl-
8	27.174	27.115	27.230	138828	4.16	49457	4.32	2.81		Phthalic acid, butyl undecyl ester
9	27.557	27.505	27.610	115801	3.47	46154	4.03	2.51		3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol
10	28.380	28.310	28.420	143673	4.31	30868	2.69	4.65		Heptacosanoic acid, methyl ester
11	28.448	28.420	28.510	122796	3.68	44788	3.91	2.74	V	Hexadecanoic acid, methyl ester
12	29.774	29.710	29.870	327157	9.81	116779	10.19	2.80		Hexadecanoic acid, ethyl ester
13	31.773	31.725	31.820	69762	2.09	24460	2.13	2.85		6-Octadecenoic acid, methyl ester, (Z)-
14	31.982	31.935	32.110	326549	9.79	84996	7.42	3.84		Phytol
15	32.852	32.810	32.900	29810	0.89	12302	1.07	2.42		Linoleic acid ethyl ester
16	32.965	32.905	33.030	136921	4.11	51505	4.49	2.66		9,12,15-Octadecatrienoic acid, ethyl ester, (Z,
17	33.443	33.390	33.520	201889	6.06	70523	6.15	2.86		Octadecanoic acid, ethyl ester
18	33.594	33.520	33.660	134256	4.03	44454	3.88	3.02	V	Heptasiloxane, hexadecamethyl-
19	33.783	33.735	33.835	138797	4.16	57084	4.98	2.43		3,7,11,15-Tetramethyl-2-hexadecen-1-ol
20	34.335	34.290	34.380	45171	1.35	17834	1.56	2.53		Dodecanoic acid, 1,1-dimethylpropyl ester
21	38.085	38.025	38.105	32264	0.97	9754	0.85	3.31	V	2,3-Dihydroxypropyl icosanoate, 2TMS deriv
22	39.014	38.950	39.130	670665	20.11	221513	19.33	3.03		Diisooctyl phthalate
23	45.577	45.515	45.615	43988	1.32	13381	1.17	3.29		3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13-Dodecamethyl-1,
				3334218	100.00	1145987	100.00			

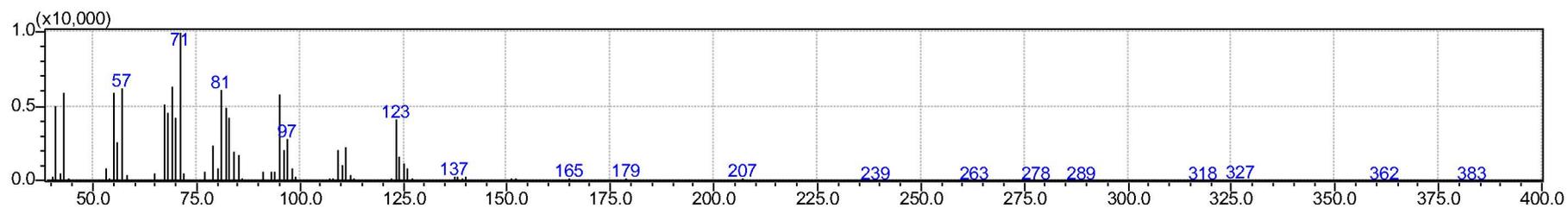
ANEXO 5 – ESPECTRO DE SIMILARIDADE 1

1. ESPECTRO DO COMPOSTO A DETECTADO EXTRATO FOLHAS

2. ESPECTRO COM 92% DE SIMILARIDADE NA BIBLIOTECA NIST: NEOFITADIENO (*NEOPHYTADIENE*)

ANEXO 6 – ESPECTRO DE SIMILARIDADE 2

1. ESPECTRO DO COMPOSTO B DETECTADO EXTRATO FOLHAS

2. ESPECTRO COM 92% DE SIMILARIDADE NA BIBLIOTECA NIST: FITOL (*PHYTOL*)