



## **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE E IMUNOMODULADORA DOS METABÓLITOS PRIMÁRIOS DE *Pereskia aculeata* Miller**

Treisse Cleiner Andrade<sup>1</sup>; Pedro Henrique Santos de Freitas<sup>1</sup>; Juliana Martins Ribeiro<sup>2</sup>,  
Priscila de Faria Pinto<sup>3</sup>; Elaine Maria de Souza-Fagundes<sup>2</sup>; Elita Scio<sup>1</sup>; Antônia Ribeiro<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratório de Produtos Naturais Bioativos, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG, Brasil.

<sup>2</sup> Laboratório de Biologia Molecular e Celular, Departamento de Fisiologia e Biofísica, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte-MG, Brasil.

<sup>3</sup> Laboratório de Estrutura e Função de Proteínas, Departamento de Bioquímica, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora-MG, Brasil.

\*Corresponding author. E-mail address: toniaribeiro@gmail.com

### **RESUMO**

O objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade antioxidante e imunomoduladora dos metabólitos primários de *Pereskia aculeata* Miller. A partir das folhas secas e trituradas de *P. aculeata*, os seguintes extratos foram preparados: extrato aquoso (EA01), extrato aquoso alcalino (EA02), extrato proteolísado da fração aquosa (EA03) e extrato proteolísado da fração alcalina (EA04). O teor de proteínas foi determinado pelo método de Bradford. A atividade antioxidante foi avaliada por meio do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, redução do complexo de fosfomolibdênio e pelo ensaio bioautográfico com DPPH. O potencial imunomodulador foi determinado sobre células mononucleares do sangue periférico humano. Os extratos EA01 e EA02 apresentaram um teor de proteínas totais de 11 e 12 %, respectivamente. Na concentração de 38,46  $\mu\text{g/mL}$ , os extratos EA01, EA02, EA03 e EA04 foram capazes de inibir a peroxidação lipídica em 42,68, 48,39, 8,67 e 6,83 %, respectivamente, quando comparados ao padrão quercetina. No método do fosfomolibdênio, os extratos EA01, EA02, EA03 e EA04 apresentaram, respectivamente, 23,69, 23,76, 12,65 e 13,56 % da capacidade antioxidante da quercetina. No ensaio bioautográfico com DPPH não foi detectada atividade antioxidante pelos extratos de *P. aculeata*. Em relação ao potencial imunomodulador, nas concentrações de 45,00 e 180,00  $\mu\text{g/mL}$ , apenas os extratos EA01 e EA02, respectivamente, foram capazes de estimular a proliferação celular. Portanto, este trabalho demonstrou uma diminuição da atividade



biológica dos extratos ricos em polissacarídeos de *P. aculeata* após a proteólise, sugerindo que as proteínas, associadas aos polissacarídeos, desempenham papel importante em suas atividades antioxidante e imunomoduladora.

**Palavras-chave:** Antioxidantes. Imunomodulação. Metabólitos Primários. Plantas Medicinais.

## ABSTRACT

This work's objective was to evaluate the antioxidant and immunomodulatory activity of the primary metabolites of *Pereskia aculeata* Miller. From the dried and crushed leaves of *P. aculeata*, aqueous extract (EA01), aqueous alkaline extract (EA02), a proteolyzed extract of the aqueous fraction (EA03) and proteolyzed extract of the alkaline fraction (EA04) were obtained. Protein content was determined using the Bradford method. The antioxidant activity was evaluated by means of the  $\beta$ -carotene/linoleic acid system, reduction of the phosphomolybdenum complex and by the bioautographic assay with DPPH. The immunomodulatory potential was determined on human peripheral blood mononuclear cells. Extracts EA01 and EA02 had a total protein content of 11 and 12 %, respectively. At a concentration of 38.46  $\mu\text{g/mL}$ , extracts EA01, EA02, EA03, and EA04 were able to inhibit lipid peroxidation by 42.68, 48.39, 8.95 and 6.83 %, respectively, when compared to quercetin. In the phosphomolybdenum method, the extract EA01, EA02, EA03, and EA04 presented 23.69, 23.76, 12.65, and 13.56 % of the antioxidant capacity of quercetin, respectively. In the bioautographic assay with DPPH, no antioxidant activity was detected by the extracts of *P. aculeata*. Regarding immunomodulatory activity, at concentrations of 45.00 and 180.00  $\mu\text{g/mL}$ , only extracts EA01 and EA02 were able to stimulate cell proliferation, respectively. Therefore, this work demonstrated a decrease in the biological activity of the aqueous rich polysaccharide extract of *P. aculeata* after proteolysis, suggesting that proteins, associated with polysaccharides, play a significant role in antioxidant and immunomodulatory activities.

**Keywords:** Antioxidants. Immunomodulation. Plants, Medicinal. *Primary Metabolites*.

## 1. INTRODUÇÃO

*Pereskia aculeata* Miller, popularmente conhecida como “ora-pro-nobis”, é uma trepadeira arbustiva da família Cactaceae (PATERSON; DOWNIE; HILL, 2009). No Brasil, encontra-se distribuída naturalmente pela Mata Atlântica, desde o Rio Grande do Sul até a Bahia (PINTO; SCIO, 2014). É uma planta alimentícia não convencional (PANC),



empregada na culinária brasileira, devido ao seu elevado teor de proteínas (TAKEITI *et al.*, 2009; ROSA; QUEIROZ; MELO, 2020). Na medicina tradicional, as folhas dessa espécie são utilizadas principalmente na cicatrização de feridas, no tratamento de processos inflamatórios e da anemia (DAMASCENO; BARBOSA, 2008; RIBEIRO NETO *et al.*, 2020).

A partir dos relatos populares, estudos foram realizados para comprovar e/ou identificar novas atividades biológicas para a espécie. Carvalho e colaboradores (2014) relataram a atividade cicatrizante *in vitro* da mucilagem extraída das folhas de *P. aculeata*. Posteriormente, Pinto e colaboradores (2016) demonstraram que os extratos metanólico e hexânico de *P. aculeata* também foram capazes de favorecer a cicatrização de feridas *in vivo*, sendo este efeito justificado por um aumento no fluxo sanguíneo e na deposição tecidual do colágeno. Extratos orgânicos das folhas de *P. aculeata* também apresentaram atividade antinociceptiva central e periférica (PINTO *et al.*, 2015), antioxidante, antimicrobiana, antifúngica (SOUZA *et al.*, 2016) e citotóxica frente a diferentes linhagens celulares, como HL-60, MCF-7 (PINTO *et al.*, 2012) e SH-SY5Y (SOUZA *et al.*, 2016).

Grande parte desses efeitos foram atribuídos à vasta composição química de *P. aculeata*, com predomínio de terpenos e polifenóis no óleo essencial (SOUZA *et al.*, 2016). Na fração hidrometanólica do extrato metanólico de *P. aculeata*, também foi relatada a presença de alcaloides e compostos fenólicos como flavonoides, cumarinas e taninos (PINTO *et al.*, 2012). Entretanto, apesar da existência de trabalhos relacionados aos metabólitos secundários, na literatura não há relatos sobre a contribuição dos metabólitos primários de *P. aculeata* sobre as atividades biológicas já descritas para a espécie. Esses compostos, como os polissacarídeos e as proteínas, podem contribuir na prevenção dos danos causados pelos radicais livres e na resposta imunológica do organismo, sendo reconhecidos por suas propriedades antioxidante, antiviral, leishmanicida, antitumoral e anticoagulante (KIOKIAS *et al.*, 2018; ULLAH *et al.*, 2019).

Portanto, a fim de ampliar o conhecimento sobre o potencial farmacológico da espécie, este trabalho teve como objetivo determinar o teor de proteínas e avaliar a atividade antioxidante dos extratos aquosos ricos em metabólitos primários de *P.*



*aculeata*, por meio do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, redução do complexo de fosfomolibdênio e pelo ensaio bioautográfico com DPPH. Além disso, o potencial imunomodulador também foi determinado sobre células mononucleares do sangue periférico humano.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Material Vegetal

As folhas de *P. aculeata* foram coletadas em Juiz de Fora, MG, Brasil, em outubro de 2015. A exsicata foi identificada pela Dra. Daniela Zappi e depositada no Herbário Leopoldo Krieger (CESJF) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF), sob nº 57539, Juiz de Fora, MG, Brasil.

### 2.2 Reagentes químicos

Diclorometano, etanol, butanol, propanol, metanol, ácido sulfúrico, alcalase, 2,2'-difetil-1-picrilhidrazila (DPPH), dimetilsulfóxido (DMSO), ácido linoleico,  $\beta$ -caroteno, Tween 40, penicilina, estreptomicina e a fungisona foram obtidos da Sigma (St. Louis, MO, EUA). O meio de separação de linfócitos, denominado de LSM (do inglês - *Lymphocyte Separation Medium*) foi obtido da Organon Teknika Corporation (Durham, NC, EUA). O meio de cultura RPMI-1640, o soro bovino fetal e a L-glutamina foram obtidos da Gibco (Grand Island, NY, EUA).

### 2.3 Processo de extração

Para delipidação do material vegetal, 50 g de folhas secas e trituradas de *P. aculeata* foram submetidas à maceração estática sucessiva com diclorometano e etanol por 24 h. Após filtração, o resíduo seco foi submetido à decocção com água destilada por 3 h à 90 °C. O filtrado da extração aquosa foi tratado com adição de etanol, gota a gota.



Em seguida, a mistura foi centrifugada a 7500 rpm durante 15 min. O sobrenadante foi descartado e o precipitado foi mantido em dessecador durante 24 h, obtendo-se 5,71 g do extrato aquoso rico em polissacarídeos (EA01). Para obtenção da fração rica em polissacarídeos de parede celular, o resíduo seco proveniente da extração aquosa foi submetido à decocção com uma solução de hidróxido de sódio 1,5 M por 3 h à 90 °C. O material vegetal foi filtrado e precipitado com etanol. Após centrifugação e secagem do precipitado em dessecador por 24 h, obteve-se 7,63 g do extrato aquoso alcalino (EA02).

### *2.3.1 Proteólise*

Para a realização da proteólise, os extratos EA01 e EA02 foram ressuspensos com cloreto de sódio 0,25 M. Em seguida, a proteólise foi realizada com adição da enzima alcalase, a pH 9,0, por 18 h à 60 °C. A mistura foi submetida a um banho de água fervente para inativação enzimática e, após resfriamento, adicionou-se ácido tricloroacético. Após repouso em banho de gelo por 15 min, o material foi centrifugado a 2500 rpm durante 15 min e o sobrenadante foi separado. Sob agitação lenta, adicionou-se o etanol ao sobrenadante para precipitação dos polissacarídeos. Após centrifugação, foram obtidos 430 mg do extrato proteolisado da fração aquosa (EA03) e 80 mg do extrato proteolisado da fração alcalina (EA04).

### **2.4 Determinação do teor de proteínas totais**

A determinação do teor de proteínas totais foi realizada de acordo com o método de Bradford (1976), com algumas modificações. Para a realização do ensaio, uma curva padrão de albumina de soro bovino (BSA) foi preparada nas concentrações de 5 a 50 µg/mL. O procedimento foi realizado transferindo-se 40 µL de reagente de Bradford, 140 µL de água MiliQ e 20 µL das amostras (1 mg/mL em água MiliQ) para microplacas de 96 poços. Após 5 min à temperatura ambiente, procedeu-se às leituras espectrofotométricas a 595 nm em leitor automático de microplacas (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific,



Inc., Waltham, MA, EUA). Para determinar a precisão dos resultados, as análises foram realizadas em triplicata. O teor de proteínas totais foi obtido por meio da equação da reta do padrão de BSA e os resultados foram expressos em mg/g  $\pm$  desvio padrão, por meio de regressão linear no software Microsoft Office Excel.

## **2.5 Avaliação da atividade antioxidante**

### *2.5.1 Sistema $\beta$ -caroteno/ácido linoleico*

O método de oxidação do sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico foi realizado de acordo com Marco (1968), com algumas modificações. Para o preparo da emulsão, 40  $\mu$ L de ácido linoleico, 75  $\mu$ L solução de  $\beta$ -caroteno (10 mg/mL) e 530  $\mu$ L de Tween 40 foram dissolvidos em 1000  $\mu$ L de clorofórmio. Após completa evaporação do clorofórmio, foram adicionados 30 mL de água destilada, previamente saturada com oxigênio por 30 min. Posteriormente, em microplacas de 96 poços, foram adicionados 250  $\mu$ L da emulsão e 10  $\mu$ L das amostras (38,46  $\mu$ g/mL). As microplacas foram incubadas a 45 °C e a leitura das absorvâncias foi realizada imediatamente ( $t = 0$  min) e após a incubação ( $t = 120$  min) a 470 nm, em leitor automático de microplacas (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA). A quercetina foi utilizada como controle positivo nas mesmas concentrações das amostras. O procedimento foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em percentual de atividade antioxidante relativa à quercetina (% AAR<sub>Q</sub>), comparando-se a absorvância das amostras com a substância de referência, que foi considerada como 100 % de inibição da peroxidação lipídica.

### *2.5.2 Redução do complexo de fosfomolibdênio*

O método utilizado para avaliar a redução do complexo de fosfomolibdênio foi proposto por Prieto e colaboradores (1999), com algumas modificações. Para o preparo do complexo de fosfomolibdênio, adicionou-se 28 mL de solução de fosfato de sódio (0,1 mol/L), 12 mL de solução de molibdato de amônio (0,03 mol/L), 20 mL de solução de



ácido sulfúrico (3 mol/L) em um balão volumétrico, sendo o volume final ajustado com água destilada para 100 mL. Em tubos de ensaio, foram adicionados 300 µL das amostras (0,2 mg/mL) e 2 mL complexo de fosfomolibdênio. Os tubos foram mantidos em banho-maria a 95 °C por 90 min. Após resfriamento, foi realizada a leitura a 695 nm, em leitor automático de microplacas (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA). O controle positivo (quercetina) e o controle negativo foram preparados nas mesmas condições das amostras. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram expressos em percentual de atividade antioxidante relativa à quercetina (% AAR<sub>Q</sub>), comparando-se a absorbância das amostras com a substância de referência, que foi considerada como 100 % de redução do complexo de fosfomolibdênio.

### *2.5.3 Ensaio bioautográfico com DPPH*

O ensaio bioautográfico com DPPH foi realizado em cromatoplasmas de cromatografia em camada delgada com gel de sílica, conforme a metodologia proposta por Soler-Rivas e colaboradores (2000). As amostras e a quercetina, substância de referência, foram dissolvidas em metanol, na proporção de 1:1 (v/v). Foram aplicados 10 µL das amostras e da quercetina sobre as cromatoplasmas, sendo eluídas com butanol, propanol, ácido acético e água, na proporção de 30:10:10:10 (v/v/v/v). Após evaporação dos solventes, as cromatoplasmas foram nebulizadas com a solução de DPPH (0,2 % em etanol). Após 30 min, foi realizada a leitura das cromatoplasmas, em que halos brancos ou amarelados, sobre o fundo violeta, foram considerados positivos.

### **2.6 Determinação da atividade imunomoduladora *in vitro***

Avaliação da atividade imunomoduladora foi realizada com células mononucleares do sangue periférico humano (CMSP), conforme já descrito por Souza-Fagundes e colaboradores (2002), com algumas modificações. As células foram obtidas de doadores saudáveis (N=6), conforme protocolo aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP) sob número 1.564.247/2016. Após obtenção das CMSP



por gradiente de Ficoll-diatrizoato, utilizando-se o LSM, as células foram semeadas em microplacas de 96 poços ( $2,0 \times 10^5$  células/poço) em presença de meio RPMI-1640, suplementado de 10 % v/v de soro fetal bovino, previamente inativado, 2mM de L-Glutamina e 1 % da mistura de antibiótico-antimicótico (solução estoque 1000 U/mL de penicilina, 1000 µg/mL de estreptomicina e 25 µg/mL de fungisona). As células foram mantidas por 24 h a 37 °C em atmosfera úmida de 5 % de CO<sub>2</sub> para estabilização, seguindo-se o tratamento com diferentes concentrações das amostras (0,70 a 180,00 µg/mL) ou com o controle positivo (mitógeno inespecífico de fitohemaglutinina (PHA 2,50 µg/mL). Como controle negativo, utilizou-se o DMSO (0,5 %). Após 96 h de incubação, a viabilidade celular foi quantificada pela adição de 20 µL da solução de resazurina (concentração final de 5 µg/mL). A leitura fluorimétrica foi realizada em dois comprimentos de onda: 530 nm (excitação) e 590 nm (emissão) - em leitor automático de microplacas (Multiskan EX, Thermo Fisher Scientific, Inc., Waltham, MA, EUA). Para retirada de interferentes da reação de resazurina com o meio de cultura, além da reação cruzada entre os extratos, resazurina e DMSO, foram realizados os brancos referente a cada amostra. Foi realizado ainda um controle de meio de cultura e resazurina que foi descontado da análise de todos os poços. O número de células viáveis se correlaciona com o percentual de redução da resazurina e foram expressos como percentual de viabilidade/proliferação seguinte forma:

$$\% \text{ viabilidade/proliferação: } (Fe - Be) \times 100 / (Fc - Bm)$$

Onde, *Fe* e *Fc* correspondem à fluorescência do extrato e do controle da célula, respectivamente, e *Be* e *Bm* referem-se ao branco do extrato e do meio, respectivamente.

## 2.7 Análise estatística

Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão. Por meio do software GraphPad Prism 7.0 (San Diego, CA, EUA), os dados foram submetidos à análise de



variância (ANOVA) seguida do teste de Bonferroni ou Dunnett para medir o grau de significância para  $p < 0,05$ .

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 Determinação do teor de proteínas totais

O teor de proteínas encontrado nos extratos aquosos e proteolisados de *P. aculeata*, está demonstrado na Tabela 1. A equação da reta obtida foi de  $y = 0,0068x + 0,0277$  com coeficiente de correlação de  $r^2 = 0,9938$ .

**Tabela 1** - Teor de proteínas dos extratos de *P. aculeata* pelo método de *Bradford*.

Amostras (100 µg/mL)	Teor de Proteínas (%)
EA01	11
EA02	12
EA03	-
EA04	-

Legenda: EA01: Extrato aquoso de *P. aculeata*; EA02: Extrato aquoso alcalino de *P. aculeata*; EA03: Extrato proteolisado da fração aquosa de *P. aculeata*; EA04: Extrato proteolisado da fração alcalina de *P. aculeata*.

Normalmente, as folhas de *P. aculeata* destacam-se por apresentarem um alto teor de proteínas, com valores entre 19,6 e 25,5 %, sendo o triptofano e a lisina os principais aminoácidos encontrados na espécie (TAKEITI *et al.*, 2009; PINTO; SCIO, 2014).

De acordo com a Tabela 1, observa-se que os extratos EA01 e EA02 apresentaram um conteúdo proteico inferior ao relatado na literatura. Essa variação pode estar relacionada à forma de obtenção do extrato, dado que no presente trabalho apenas proteínas solúveis presentes nos extratos aquosos foram quantificadas, enquanto nos demais estudos, as proteínas totais foram calculadas através da quantificação de nitrogênio (MIRANDA SOUZA *et al.*, 2016).

Os extratos EA01 e EA02 foram submetidos ao processo de proteólise para separação dos polissacarídeos das proteínas solúveis. Dessa forma, comprovou-se a

eficiência do processo de proteólise para obtenção dos extratos EA03 e EA04, visto que ambos não apresentaram teor de proteínas significativo pelo método de Bradford.

### 3.2 Avaliação da atividade antioxidante

Os resultados encontrados para a atividade antioxidante dos extratos de *P. aculeata* pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e pela redução do complexo de fosfomolibdênio estão demonstrados na Tabela 2.

**Tabela 2** - Atividade antioxidante dos extratos de *P. aculeata* pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e pela redução do complexo de fosfomolibdênio.

Amostras	$\beta$ -caroteno/ácido linoleico (% AAR <sub>Q</sub> )	Fosfomolibdênio (% AAR <sub>Q</sub> )
EA01	42,68 ± 0,11****	23,69 ± 0,27****
EA02	48,39 ± 0,06****	23,76 ± 2,00****
EA03	8,67 ± 0,00****	12,65 ± 2,28****
EA04	6,83 ± 0,02****	13,56 ± 0,18****
Quercetina	100	100

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 3) do % AAR<sub>Q</sub>. ANOVA, seguida por Bonferroni. Valores significativos: p\*\*\*\* < 0,0001 vs substância de referência (quercetina). Legenda: EA01: Extrato aquoso de *P. aculeata*; EA02: Extrato aquoso alcalino de *P. aculeata*; EA03: Extrato proteolísado da fração aquosa de *P. aculeata*; EA04: Extrato proteolísado da fração alcalina de *P. aculeata*; % AAR<sub>Q</sub>: Percentual de atividade antioxidante relativa à quercetina.

O sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico avalia a capacidade dos extratos vegetais de impedir o descolorimento do  $\beta$ -caroteno por meio da doação de átomos de hidrogênio aos peróxidos formados a partir do ácido linoleico (ALVES *et al.*, 2010). Dessa forma, a presença de compostos antioxidantes no meio reacional, minimiza o descolorimento do substrato lipídico, por meio da neutralização das espécies reativas (SANG *et al.*, 2014).

Conforme demonstrado na Tabela 2, os extratos EA01, EA02, EA03 e EA04 foram considerados estatisticamente diferentes em relação à quercetina (p < 0,0001), utilizada como substância de referência. A atividade antioxidante da quercetina, principal representante da classe dos flavonóis, pode ser justificada, pelo menos em parte, pela presença de hidroxilas fenólicas reativas em sua estrutura (DUARTE-ALMEIDA *et al.*, 2006; LESJAK *et al.*, 2018).



Os trabalhos relacionados com o potencial antioxidante das folhas de *P. aculeata*, atribuem tal atividade aos metabólitos secundários, principalmente aos compostos fenólicos e flavonoides (MORAES *et al.*, 2020). Entretanto, no presente trabalho, constatou-se que os metabólitos primários também podem estar relacionados à capacidade de inibição da peroxidação lipídica, visto que os extratos EA01 e EA02 apresentaram uma moderada atividade antioxidante pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico (Tabela 2). Além disso, observou-se uma diminuição considerável da atividade antioxidante nos extratos EA03 e EA04, sugerindo que as proteínas, quando associadas aos polissacarídeos, têm influência na inibição da peroxidação lipídica.

O método de redução do complexo de fosfomolibdênio também foi utilizado para avaliação da atividade antioxidante dos extratos aquosos de *P. aculeata*. Esse ensaio consiste na redução do molibdênio (VI) a molibdênio (V) ocorrida em presença de substâncias com capacidade antioxidante, com subsequente formação de um complexo verde entre fosfato/molibdênio (V) mensurado por espectrofotometria (BALESTRIN *et al.*, 2008).

De acordo com a Tabela 2, os extratos de *P. aculeata* apresentaram uma reduzida atividade antioxidante pelo método de redução do complexo de fosfomolibdênio. Além disso, foi possível constatar que esse efeito foi inferior nos extratos EA03 e EA04, quando comparados aos extratos EA01 e EA02, sugerindo, novamente, que a conjugação carboidrato-proteína aumenta a capacidade antioxidante de *P. aculeata*.

O ensaio bioautográfico com DPPH é um dos métodos mais comumente empregados na avaliação da atividade antioxidante, devido à rapidez, praticidade e eficiência na triagem de extratos vegetais (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). O método baseia-se na capacidade de neutralização do radical livre estável DPPH, de coloração violeta, que ao ser reduzido pela espécie antioxidante, promove a formação de uma coloração amarela (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995).

Após nebulização das cromatoplacas com a solução de DPPH, não foram observadas manchas amarelas em fundo roxo, características do ensaio, em nenhuma das amostras analisadas (EA01, EA02, EA03 e EA04). Em contrapartida, Pinto e colaboradores



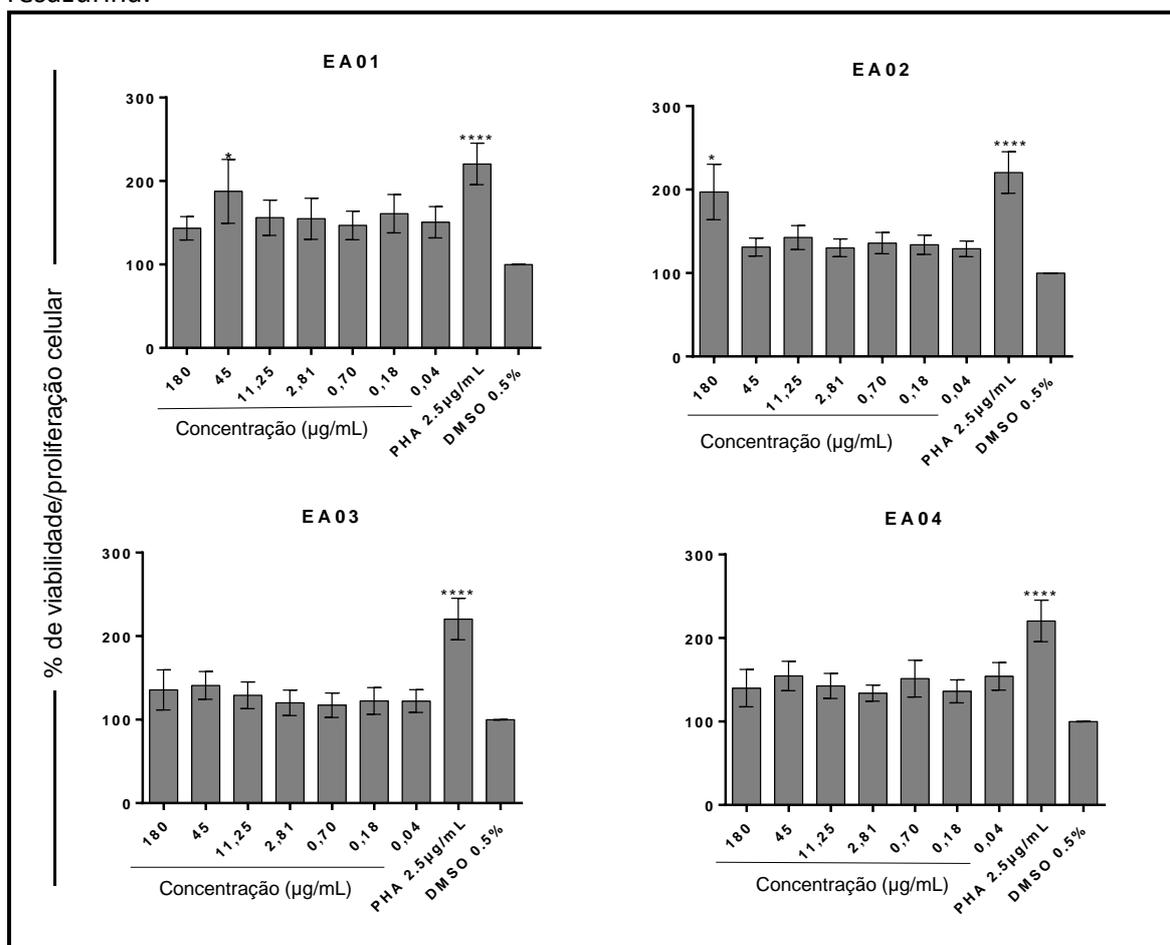
(2012) demonstraram que o extrato metanólico e suas frações apresentaram potencial antioxidante no ensaio bioautográfico com DPPH, sendo essa atividade atribuída aos metabólitos secundários, principalmente aos compostos fenólicos.

O resultado apresentado no ensaio bioautográfico com DPPH, não inviabiliza o moderado potencial antioxidante dos metabólitos primários de *P. aculeata* demonstrado pelo sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico, visto que ambos os ensaios utilizam metodologias distintas (ALVES *et al.*, 2010). Outro ponto a ser considerado é que o íon radicalar formado pelo DPPH não apresenta semelhança com os radicais livres encontrados nos sistemas biológicos (OLIVEIRA *et al.*, 2015). Além disso, no presente estudo, o ensaio bioautográfico com DPPH apresentou algumas limitações relacionadas à solubilização e aplicação das amostras nas cromatoplas de cromatografia em camada delgada

### **3.3 Determinação da atividade imunomoduladora**

A atividade imunomoduladora para os extratos de *P. aculeata* está demonstrada na Figura 1.

**Figura 1** - Atividade imunomoduladora dos extratos de *P. aculeata* em células mononucleares do sangue periférico humano por meio do método de redução da resazurina.



Os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão (n = 6). ANOVA, seguida por Dunnett. Valores significativos:  $p^{****} < 0,0001$ ,  $p^* < 0,02$  vs DMSO 0,5% (controle negativo). Legenda: DMSO: Dimetilsulfóxido; EA01: Extrato aquoso de *P. aculeata*; EA02: Extrato aquoso alcalino de *P. aculeata*; EA03: Extrato proteolisado da fração aquosa de *P. aculeata*; EA04: Extrato proteolisado da fração alcalina de *P. aculeata*; PHA: Mitógeno inespecífico de fitohemaglutinina (controle positivo).

O sistema imunológico desempenha um papel crucial na proteção do organismo contra infecções virais, bacterianas e fúngicas (CHEN *et al.*, 2018). Estudos têm constatado que as plantas são uma fonte valiosa de substâncias químicas úteis na modulação do sistema imune, com atividades imunoestimuladoras, imunossupressoras e/ou imunorregulatórias, sendo esses compostos denominados de imunomoduladores (SOUZA-FAGUNDES *et al.*, 2002; PATWARDHAN; MANISH, 2005). Além dos metabólitos secundários, os metabólitos primários também têm demonstrado diferentes funções no



sistema imunológico, incluindo a ativação da imunidade celular e humoral (SEYFRIED *et al.*, 2016).

Diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* podem ser utilizados para determinar a atividade imunomoduladora de extratos vegetais (AKRAM *et al.*, 2014). No presente estudo, optou-se por utilizar o ensaio de proliferação das células mononucleares do sangue periférico humano frente ao PHA, visto que esse composto é capaz de estimular a mitose de linfócitos na cultura celular (SOUZA-FAGUNDES *et al.*, 2002). Como indicativo da viabilidade celular, utilizou-se a resazurina, que ao sofrer redução para resorufina, adquire uma coloração rósea fluorescente. Dessa forma, a conversão da resazurina para resorufina é diretamente proporcional ao número de células viáveis, metabolicamente ativas e que, conseqüentemente, estão em proliferação (BUNEL *et al.*, 2014).

Como demonstrado na Figura 1, os extratos aquoso e alcalino de *P. aculeata*, na concentração de 45,00 µg/mL para EA01 e de 180,00 para EA02, foram capazes de estimular a proliferação celular indicando atividade imunomoduladora, em relação ao controle positivo (PHA 2,5 µg/mL). A estimulação da proliferação celular não foi observada nos extratos EA03 e EA04. Ao comparar todos os extratos com o controle negativo (DMSO 0,50 %), foi possível observar efeito estimulador da proliferação celular, como observado para o PHA, controle positivo que sabidamente estimula a proliferação celular conforme já documentado na literatura (SOUZA-FAGUNDES *et al.*, 2002). Também não foi detectada citotoxicidade significativa para nenhuma das concentrações testadas.

Dessa forma, sugere-se que os metabólitos primários associados (carboidrato e proteína) de *P. aculeata* apresentam atividade imunomestimuladora *in vitro*, sendo que essa atividade praticamente não foi detectada nos extratos após a proteólise. Mais uma vez, esses resultados corroboram com os achados encontrados nos testes de atividade antioxidante (Tabela 2), visto que os polissacarídeos de *P. aculeata* apresentam atividade biológica reduzida após eliminação das proteínas.

Na literatura, não há relatos da atividade imunomoduladora dos metabólitos primários de *P. aculeata*. Entretanto, investigações relacionadas a células tumorais, HL-60 e MCF-7, demonstraram que os metabólitos secundários de *P. aculeata* apresentam



propriedades antiproliferativas, não sendo observado tal efeito em células não tumorais (PINTO *et al.*, 2012). Além disso, Carvalho e colaboradores (2014) observaram que o extrato hidroetanólico de *P. aculeata* não apresentou efeitos citotóxicos sobre a linhagem celular de fibroblastos. Assim, as informações encontradas neste trabalho são relevantes, visto que extratos vegetais que favorecem a proliferação celular podem estimular o sistema imunológico, objetivando o fortalecimento gradual do organismo e a eliminação de agentes infecciosos (NUNES-PINHEIRO *et al.*, 2002; AKRAM *et al.*, 2014).

#### **4. CONCLUSÃO**

Este trabalho demonstrou uma diminuição da atividade biológica dos extratos aquosos de *P. aculeata* após a proteólise, sugerindo que as proteínas, associadas aos polissacarídeos, desempenham um papel importante nas atividades antioxidante e imunomoduladora da espécie. Observou-se ainda que a atividade antioxidante dos metabólitos primários foi inferior à encontrada na literatura para os metabólitos secundários da espécie. Não se descarta, entretanto, a possibilidade da existência de sinergismo entre os metabólitos primários e os secundários dessa espécie vegetal, de forma a potencializar suas atividades biológicas. Desta forma, o isolamento e a caracterização estrutural dos metabólitos primários de *P. aculeata* ampliariam as possibilidades de novas pesquisas sobre suas atividades biológicas, levando em consideração as atividades antioxidante e imunomoduladora já determinadas neste trabalho para os extratos aquosos dessa espécie vegetal.

#### **AGRADECIMENTOS**

Os autores agradecem a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF). Os autores agradecem a Dra. Elaine Maria de Souza Fagundes, do Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal



de Minas Gerais (UFMG), e ao Delfino Antônio Campos, do Laboratório de Produtos Naturais Bioativos da UFJF, pela assistência técnica.

## REFERÊNCIAS

AKRAM, M.; HAMID, A.; KHALIL, A.; GHAFAR, A.; TAYYABA, N.; SAEED, A.; ALI, M.; NAVEED, A. Review on medicinal uses, pharmacological, phytochemistry and immunomodulatory activity of plants. **International Journal of Immunopathology and Pharmacology**, v. 27, n. 3, p. 313-19, 2014.

ALVES, C. Q.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P.; BAHIA, M. V.; AGUIAR, R. M. Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. **Química Nova**, v. 33, n. 10, p. 2202-10, 2010.

BALESTRIN, L.; DIAS, J. F.; GOMES MIGUEL, O.; DALL' STELLA, D. S. G.; DALLARMI MIGUEL, M. Contribuição ao estudo fitoquímico de *Dorstenia multiformis* Miquel (Moraceae) com abordagem em atividade antioxidante. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 18, n. 2, p. 230-35, 2008.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976.

BRAND-WILIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p. 25-30. 1995.

BUNEL, V.; OUEDRAOGO, M.; NGUYEN, A. T.; STÉVIGNV, C.; DUEZ, P. Methods applied to the *in vitro* primary toxicology testing of natural products: state of the art, strengths, and limits. **Planta Med.**, v. 80, n. 14, p. 1210-26, 2014.

CARVALHO, E. G.; SOARES, C. P.; BLAU, L.; MENEGON, R. F.; JOAQUIM, W. M. Wound healing properties and mucilage content of *Pereskia aculeata* from different substrates. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 24, p. 677-82, 2014.

CHEN, X.; LIU, S.; GORAYA, M. U.; MAAROUF, M.; HUANG, S.; CHEN, J. L. Host immune response to influenza A virus infection. **Frontiers in Immunology**, v. 9, 320, 2018.

DAMASCENO, A. D. A.; BARBOSA, A. A. A. Levantamento etnobotânico de plantas do bioma cerrado na comunidade de Martinesia, Uberlândia, MG. **Horiz. Cient.**, v. 2, p. 2-30, 2008.



DUARTE-ALMEIDA, J. M.; SANTOS, R. J.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema  $\beta$ -caroteno/ácido linoleico e método de sequestro de radicais DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 2, p. 446-52, 2006.

KIOKIAS, S.; PROESTOS, C.; OREOPOULOU, V. Effect of natural food antioxidants against LDL and DNA oxidative changes. **Antioxidants**, v. 7, n. 10, 133, 2018.

LESJAK, M.; BEARA, I.; SIMIN, N.; PINTAĆ, D.; MAJKIĆ, T.; BEKVALAC, K.; ORČIĆ, D.; MIMICA-DUKIĆ, N. Antioxidant and anti-inflammatory activities of quercetin and its derivatives. **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 68-75, 2018.

MARCO, G. A rapid method for evaluation of antioxidants. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 45, p. 594-598, 1968.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v. 130, n. 4, p. 1036-43, 2012.

MIRANDA SOUZA, M. R.; PEREIRA, P. R. G.; MAGALHÃES, I. P. B.; SEDIYAMA, M. A. N.; VIDIGAL, S. M.; MILAGRES, C. S. F.; BARACAT-PEREIRA, M. C. Mineral, protein and nitrate contents in leaves of *Pereskia aculeata* subjected to nitrogen fertilization. **Pesq. Agropec. Trop.**, v. 46, n. 1, p. 43-50, 2016.

MORAES, T. V.; SOUZA, M. R. A.; SIMÃO, J. L. S.; ROCHA, C. B.; MOREIRA, R. F. A. Antioxidant potential of the *Pereskia aculeata* Miller species: a Bibliometric analysis. **Brazilian Journal of Surgery and Clinical Research**, v. 29, n. 1, p. 79-85, 2020.

NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; LEITE, A. K. R. M.; FARIAS, V. M.; BRAGA, L. T.; LOPES, C. A. P. Immunomodulatory activity of the medicinal plants: perspectives for veterinary medicine. **Ciência Animal**, v. 13, n. 1, p. 23-32, 2003.

OLIVEIRA, G. L. S. Determinação da capacidade antioxidante de produtos naturais *in vitro* pelo método do DPPH•: estudo de revisão. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.17, n.1, p.36-44, 2015.

PATERSON, I. D.; DOWNIE, D. A.; HILL, M. P. Using molecular methods to determine the origin of weed populations of *Pereskia aculeata* in South Africa and its relevance to biological control. **Biological Control**, v. 48, n. 1, p. 84-91, 2009.

PATWARDHAN, B.; MANISH, G. Botanical immunodrugs: scope and opportunities. **Drug Discov. Today**, v. 10, p. 495-502, 2005.

PINTO, N. C. C., CASSINI-VIEIRA, P., SOUZA-FAGUNDES, E. M., BARCELOS, L. S., CASTAÑON, M. C., SCIO, E. *Pereskia aculeata* (Miller) leaves accelerate excisional wound healing in mice. **J. Ethnopharmacol.**, v. 194, p. 131-36, 2016.



PINTO, N. C. C.; DUQUE, A. P. N.; PACHECO, N. R.; MENDES, R. F.; MOTTA, E. V. S.; BELLOZI, P. M. Q.; RIBEIRO, A.; SALVADOR, M. J.; SCIO, E. *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53 n. 12, p. 1780-85, 2015.

PINTO, N. C. C.; SANTOS, R. C.; MACHADO, D. C.; FLORÊNCIO, J. R.; FAGUNDES, E. M. Z.; ANTINARELLI, L. M. R.; COIMBRA, E. S.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. **Pharmacology online**, v. 3, p. 63–69, 2012.

PINTO, N. C. C.; SCIO, E. The biological activities and chemical composition of *Pereskia species* (Cactaceae)- a review. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 69, p. 189-95, 2014.

PRIETO, P.; PINEDA, M.; AGUILAR, M. Spectrophotometric quantification of antioxidant capacity through the formation of a fosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. **Anal Biochem**, v. 269, p. 337-341, 1999.

RIBEIRO NETO, J. A.; TARÔCO, B. R. P.; SANTOS, H. B.; THOMÉ, R. G.; WOLFRAM, E.; RIBEIRO, R. I. M. A. Using the plants of Brazilian Cerrado for wound healing: From traditional use to scientific approach. **J. Ethnopharmacol.**, v. 260, 112547, 2020.

ROSA, L.; QUEIROZ, C. R. A. A.; MELO, C. M. T. Fresh leaves of ora-pro-nóbis in cakes prepared from commercial pre-mixture. **Biosci. J.**, v. 36, n. 2, p. 376-382, 2020.

SANG, S. Y.; JAMHAREE, F.; PRASAD, K. N.; AZLAN, A.; MALIKI, N. Influence of drying treatments on antioxidant capacity of forage legume leaves. **Journal Of Food Science And Technology**, v. 51, n. 5, p. 988-93, 2011.

SEYFRIED, M.; SOLDERA-SILVA, A.; BOVO, F.; STEVAN-HANCKE, F. R.; MAURER, J. B. B.; ZAWADZKIBAGGIO, S. F. Pectinas de plantas medicinais: características estruturais e atividades imunomoduladoras. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v. 18, n. 1, p. 201-14, 2016.

SOLER-RIVAS, C.; ESPÍN, J. C.; WICHERS, H. J. An easy and fast test to compare total free radical scavenger capacity of foodstuffs. **Phytochemical Analysis**, v. 11, n. 5, p. 330-338, 2000.

SOUZA-FAGUNDES, E. M.; QUEIROZ, A. B. R.; FILHO, O. A. S.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ALVES, T. M. A.; ZANI, C. L. Screening and fractionation of plant extracts with antiproliferative activity on human peripheral blood mononuclear cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 8, p. 1207-1212, 2002.

SOUZA, L. F.; CAPUTO, L.; BARROS, I. B. I.; FRATIANNI, F.; NAZZARO, F.; DE FEO, V. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **Int. J. Mol. Sci.**, v. 17, 1478, 2016.



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

ULLAH, S.; KHALIL, A. A.; SHAUKAT, F.; SONG, Y. Sources, extraction and biomedical properties of polysaccharides. **Foods**, v. 8, n. 8, 304, 2019.

**Received:** 11 September 2020

**Accepted:** 13 September 2020

**Published:** 02 April 2021