

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

BARBARA FERREIRA BRITES

**PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO BRUTO E ATIVIDADE ANTICÂNCER E
ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Stachys byzantina* K. Koch**

CAMPO GRANDE – MS
2022

BARBARA FERREIRA BRITES

**PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO BRUTO E ATIVIDADE ANTICÂNCER E
ANTIMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Stachys byzantina* K. Koch**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: A biodiversidade do pantanal e cerrado e suas relações e aplicações na saúde.

Orientadora: Professora Doutora
Danielle Bogo.

Coorientadora: Professora Doutora Rita
de Cássia Avellaneda Guimarães

CAMPO GRANDE – MS
2022

BARBARA FERREIRA BRITES

**PERFIL DE ÁCIDOS GRAXOS DO ÓLEO BRUTO E ATIVIDADE ANTICÂNCER E
ANTOMICROBIANA DAS FOLHAS DE *Stachys byzantina* K. Koch**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: A biodiversidade do pantanal e cerrado e suas relações e aplicações na saúde.

Orientadora: Professora Doutora Danielle Bogo.

Coorientadora: Professora Doutora Rita de Cássia Avellaneda Guimarães

Banca examinadora:

Nota/conceito

Danielle Bogo – FACFAN – UFMS (presidente)

Juliana Rodrigues Donadon – FACFAN – UFMS

Raquel Pires Campos – FACFAN – UFMS

AVALIAÇÃO FINAL: (X) Aprovada

() Reprovada

Dedico este trabalho aos meus queridos pais e base da minha vida, Sr. Aristides Brites e a Sr.^a Lourdes de Lima Ferreira, ao meu esposo Weld Vicente de Carlos, meus filhos: Lucas e Antônio e aos meus irmãos: Débora e Allan. A família que está no meu coração pela força, motivação e pela contribuição no alcance dos meus objetivos, pelo amor e carinho. Amo muito vocês. Dedico também, às minhas orientadora e coorientadora pela confiança e amizade, que acreditaram e sempre me apoiaram e me incentivaram, prof^a Dr^a Danielle Bogo e Prof^a Dr^a Rita de Cássia Avellaneda Guimarães.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, por sempre estar ao meu lado, por me receber e me conduzir nos momentos mais difíceis. Agradeço em especial à Prof.^a Dra. Danielle Bogo, minha orientadora, acima de tudo pela amizade e pela confiança, e paciência, me apontando sempre a direção correta. E pela oportunidade, apoio e colaboração ao meu crescimento e desenvolvimento deste projeto. À Prof. Dra. Luciana Miyagusku pelo acompanhamento e auxílio no projeto, por tudo que me ensinou e colaborou para meu crescimento e realização do projeto. Aos amigos e aos técnicos de laboratório Marcio, Osmar, David, Caroline, Stephany e ao grupo de pesquisa da INQUI, as alunas e técnicas do laboratório de Biologia Molecular: Cris, Verônica, Evellyn e Gabriela, por todo apoio e por tudo que me ensinaram e colaboraram, e também um agradecimento em especial aos amigos; Ângela T. Conte e seu esposo Thiago, ao amigo David Machate que foi imprescindível à execução do trabalho, à Ana Paula G. Seemann que me ajudou com a matéria prima. A todos que de alguma forma contribuíram para a realização desse projeto. Ao Programa de Pós-Graduação Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul e todos os professores vinculados a ele.

RESUMO

Stachys byzantina K Koch, cujo nome popular é peixinho-da-horta, é uma planta alimentícia não convencional (PANC), e vem sendo mais utilizada para fins alimentícios, destacando-se o seu uso ainda para fins medicinais. Apesar de seu destaque recente, como planta alimentícia, informações importantes de suas características e propriedades no campo alimentício necessitam de estudos e comprovações. A presente pesquisa tem por objetivo determinar o perfil de ácidos graxos do óleo bruto do extrato das folhas de *Stachys byzantina*, avaliar a capacidade antimicrobiana e sua atividade anticâncer. As folhas foram coletadas na Horta Flor do Cerrado em Campo Grande, MS. O perfil de ácidos graxos foi determinado por análise cromatográfica, a sua caracterização foi feita conforme os índices de qualidade e identidade do óleo bruto: índice de iodo, índice de acidez e índice de peróxido. Os experimentos foram realizados em triplicata, analisados estatisticamente e organizados em tabelas e gráficos. Para avaliação da atividade anticâncer foi utilizado o ensaio de citotoxicidade com o corante SRB e para a atividade antimicrobiana foi utilizado o teste de difusão em disco e a determinação da concentração inibitória mínima (CIM). Os resultados obtidos demonstraram que o óleo bruto é composto majoritariamente por ácidos graxos poli-insaturados sendo o ácido alfa linolênico, ácido linoleico e ácido palmítico, os seus principais componentes. Na análise espectrométrica Uv-Vis óleo bruto indicou a presença de tocoferóis, carotenoides e clorofila. Na avaliação da atividade antimicrobiana não apresentou inibição nas cepas testadas. Na atividade anticâncer o óleo bruto demonstrou atividade nas células de U251 (glioma), B16F10 (melanoma) e MCF7 (mama) e não apresentou citotoxicidade nas células normais 3T3. Os demais extratos testados apresentaram atividade B3 (extrato hidroetanólico) e B4 (extrato hidroacetônico) nas células B16F10 (melanoma), os extratos também não apresentaram citotoxicidade nas HUVEC (células humanas de cordão umbilical).

Descritores: Óleos de plantas. Lamiaceae. Agente Antineoplásico

ABSTRACT

Stachys byzantina K Koch, whose popular name is peixinho-da-horta, is an unconventional food plant (PANC), and has been more used for food purposes, highlighting its use for medicinal purposes. Despite its recent prominence as a food plant, important information on its characteristics and properties in the food field need studies and evidence. The present research aims to determine the fatty acid profile of the crude oil from the extract of *Stachys byzantina* leaves, to evaluate the antimicrobial capacity and its anticancer activity. The leaves were collected at Horta Flor do Cerrado in Campo Grande, MS. The fatty acid profile was determined by chromatographic analysis, its characterization was carried out according to the quality and identity indices of the crude oil: iodine value, acidity index and peroxide value. The experiments were performed in triplicate, statistically analyzed and organized in tables and graphs. To evaluate the anticancer activity, the cytotoxicity assay with the SRB dye was used and for the antimicrobial activity, the disk diffusion test and the determination of the minimum inhibitory concentration (MIC) were used. The results obtained showed that the crude oil is mainly composed of polyunsaturated fatty acids, with alpha linolenic acid, linoleic acid and palmitic acid being its main components. In the spectrometric analysis UV-Vis crude oil indicated the presence of tocopherols, carotenoids and chlorophyll. In the evaluation of the antimicrobial activity, there was no inhibition in the tested strains. In terms of anticancer activity, the crude oil showed activity on U251 (glioma), B16F10 (melanoma) and MCF7 (breast) cells and did not show cytotoxicity on normal 3T3 cells. The other extracts tested showed B3 (hydroethanolic extract) and B4 (hydroacetic extract) activity on B16F10 (melanoma) cells, the extracts also did not show cytotoxicity on HUVEC (human umbilical cord cells).

Descriptors: Plant oils. Lamiaceae. Antineoplastic Agent

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Concentração em rotaevaporador do óleo bruto da <i>Stachys byzantina</i> ._____	18
Figura 2 – Estrutura básica dos ácidos graxos._____	19
Figura 3 – Estrutura dos principais ácidos graxos encontrados na natureza.____	20
Figura 4 – Exsicata <i>Stachys byzantina</i> ._____	24
Figura 5 – Obtenção da farinha de peixinho da horta, em moinho_____	24
Figura 6 – Esterificação do óleo bruto da <i>Stachys byzantina</i> ._____	27
Figura 7 – Diluições do óleo bruto para Análise Cromatográfica UV-Vis._____	30
Figura 8 – Ativação e Preparação das suspensões correspondente a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL._____	34
Figura 9 – Impregnação dos discos estéreis <i>S.byzantina</i> _____	35
Figura 10 – Antibiograma de <i>E. coli</i> _____	36
Figura 11 – Porcentagem (%) dos principais ácidos graxos encontrados no óleo bruto de <i>Stachys byzantina</i> ._____	38
Figura 12 – Porcentagem (%) das classificações de AG. AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos monoinsaturados, AGCL: ácidos graxos de cadeia longa, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados, ω -3: família ômega3, ω -6: família ômega 6._____	41
Figura 13 – Espectro de UV-Vis de óleo bruto das folhas de <i>Stachys byzantina</i> ._____	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição centesimal das folhas de <i>Stachys byzantina</i>	37
Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos das folhas de peixinho-da-horta (<i>Stachys byzantina</i>).....	38
Tabela 3 – Caracterização físico-química do óleo bruto das folhas de <i>Stachys byzantina</i>	42
Tabela 4 – Valores de inibição de crescimento (GI50)* do óleo bruto de <i>Stachys bizantina</i> e seus extratos em linhagens 786-0 (carcinoma de rim), MCF7 (carcinoma de mama), B16-F10 (melanoma murino)	45
Tabela 5 - Valores de inibição de crescimento (GI50)* dos extratos de <i>Stachys byzantina</i> em linhagens B16-F10 (melanoma murino), HUVEC (células humanas de cordão umbilical), PC -3 (adenocarcinoma de próstata) e NIH/3T3 (células normais)	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AAL	Ácido alfa-linolênico
AG	Ácido graxo
AGCL	Ácido graxo de cadeia longa
AGI	Ácido graxo insaturado
AGMI	Ácido graxo monoinsaturado
AGPI	Ácido graxo poli-insaturado
AGS	Ácido graxo saturado
AL	Ácido linoleico
ATCC	do inglês " <i>American Type Culture Collection</i> "
C	Concentração
CG-EM	Cromatografia gasosa - espectrometria de massa
CLSI	do inglês " <i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i> "
cm	Centímetro
CO ₂	Dióxido de carbono
DHA	Ácido docosahexaenoico
EPA	Ácido eicosapentaenoico
FACFAN	Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
g	Gramas
GI50	Inibição do crescimento em 50%
g/L	Gramas por litro
h	Hora
H ₂ SO ₄	Ácido sulfúrico
HT-29	Carcinoma de cólon
HTB-38	Carcinoma de cólon

INCQS	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
INQUI	Instituto de Química
KI	Iodeto de potássio
KOH	Hidróxido de potássio
M	Molar
MeOH	Metanol
MH	Ágar Mueller-Hinton
min.	Minuto
mL	Mililitro
mm	Milímetro
m/v	Massa em volume
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NH ₄ Cl	Cloreto de amônio
nm	Nanômetro
PANC	Planta alimentícia não convencional
PC-03	Linhagem celular de carcinoma de próstata
SRB	Sulforodamina B
UFC/mL	Unidade formadora de colônia por mililitro
UFMS	Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UI	Unidade internacional
UNITAL	Unidade de Tecnologia em Alimentos
V	Volume
µL	Microlitro
µg	Micrograma
ω-3	Ômega 3
3T3	Linhagem celular de fibroblasto murino
786-0	Linhagem celular de carcinoma de rim
°C	Grau Celsius
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 Alimentação e PANC	14
2.2 A <i>Stachys byzantina</i> K. Koch (peixinho-da-horta).....	15
2.3 Ácidos graxos.....	18
2.4 Ensaios de citotoxicidade.....	21
2.5 Propriedade antimicrobiana	22
3. OBJETIVOS.....	22
3.1 Objetivo geral.....	22
4. METODOLOGIA	23
4.1 Tipo, local e período da pesquisa	23
4.2 Matéria prima	23
4.3 Composição Centesimal das folhas de <i>Stachys byzantina</i>	24
4.4 Extração do óleo	26
4.5 Perfil de ácidos graxos.....	27
4.5 Análise do óleo bruto quanto às suas características	27
4.5.1 Determinação do índice de acidez.....	27
4.5.2 Determinação do índice do peróxido	28
4.5.3 Determinação do índice de iodo por cálculo	28
4.5.4 Análise óptica dos óleos: absorção UV-Vis e matriz de fluorescência de emissão-excitação	29
4.6 Obtenção dos Extratos para atividade antimicrobiana e anticâncer.....	30
4.7 Avaliação da atividade anticâncer <i>in vitro</i> do óleo da <i>Stachys byzantina</i>	30
4.7.1 Preparo das amostras-teste.....	31
4.7.2 Testes de citotoxicidade	32
4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo da <i>Stachys byzantina</i>	33
4.8.1 Teste de difusão em disco	34

4.9 Organização e análise dos dados	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1 Composição centesimal das folhas de <i>Stachys byzantina</i>	37
5.2 Composição do óleo bruto de <i>Stachys byzantina</i>	38
5.3 Perfil de ácidos graxos do óleo bruto de <i>Stachys byzantina</i> determinado pela CG-FID.....	38
5.4 Análise do óleo bruto quanto às suas características	42
5.5 Análise espectrométrica: UV-Vis.....	44
5.6 Avaliação da atividade anticâncer <i>in vitro</i> do óleo da <i>Stachys byzantina</i>	45
5.7 Atividade antimicrobiana	47
6. CONCLUSÃO	48
REFERÊNCIAS	49

1. INTRODUÇÃO

A alimentação da população brasileira é uma preocupação latente, pois levando em consideração seus princípios deve garantir variedade de nutrientes e alimentos seguros. Uma alimentação nutritiva e diversa está diretamente relacionada a uma população mais saudável. Em decorrência de uma alimentação empobrecida, dados recentes indicam a elevação de doenças como obesidade, hipertensão e diabetes, exemplos de mudanças nos hábitos da sociedade brasileira (SEGALL-CORRÊA, MARIN-LEON, 2009)

As PANC (Plantas alimentícias não convencionais) são vegetais ou partes deles: raízes, tubérculos, bulbos, rizomas, colmos, talos, folhas, brotos, flores, frutos e sementes, que não são popularmente consumidos como alimento, mas que podem passar a ser e com isso garantir as necessidades nutricionais necessárias a população. De acordo com estimativas consome-se 10% das quase 300 mil espécies pelo mundo (KINUPP; LORENZI, 2014). Esse consumo perpassa por um resgate alimentar, visto que algumas PANC são consumidas regionalmente ou por populações mais tradicionais, hábitos que se não forem resgatados podem perder-se (RANIERI, 2017).

Diante deste quadro, o peixinho-da-horta é uma das PANC que tem apresentado uma boa aceitabilidade tanto no paladar quanto no seu cultivo. O peixinho segundo estudos possui atividades biológicas potenciais como atividade antimicrobiana e anticâncer. Seu consumo tem se ampliado no Brasil, sendo encontrado em hortas orgânicas, supermercados e em cardápios de restaurantes renomados. Estudá-lo torna-se necessário para que se possa conhecer seus nutrientes, atividades biológicas, de forma a potencializar seu consumo (CASTRO; DEVIDE, 2016; SILVEIRA, 2017).

Os ácidos graxos (AG) são os principais componentes dos lipídeos, tem atuação essencial no organismo humano, nas células, vitaminas lipossolúveis e prevenção de doenças cardiovasculares (DAMODARAN; PARKIN, 2019). A maneira de adquiri-los é através da alimentação, investigar a quantidade e qualidade dos AG encontrados no peixinho-da-horta é importante para reconhecer o potencial de seu consumo.

Na literatura cita-se o uso dessa planta empanada e frita, é relatado também um sabor que se assemelha ao do peixe, assim como seu formato. Tem sido

utilizada também na forma de chá e adicionada a produtos de panificação (KINUPP; LORENZI, 2014). Seu consumo é realizado como PANC, estudá-la pode garantir mais segurança aos seus consumidores. Determinar o perfil de ácidos graxos do peixinho-da-horta vai permitir compreender as suas propriedades biológicas, nutricionais.

Este trabalho objetiva estudar as aplicações da *Stachys byzantina* K. Koch e suas propriedades biológicas. O estudo se torna importante no sentido de contribuir socialmente para a oferta de alimentos com qualidade nutricional a todos os brasileiros, cientificamente apresenta propriedades promissoras como atividade antioxidante e antimicrobiana e economicamente para valorização de um produto vendido por pequenos agricultores, agregando valor a um produto pouco consumido comercialmente.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alimentação e PANC

O Brasil apresenta uma das mais abrangentes biodiversidades mundiais, por isso estudar a flora é essencial para que se possa usar suas potencialidades com consciência e sustentabilidade. Dito isso, as PANC compõem uma saída fundamental para expandir a oferta de nutrientes e adequar à crescente procura por alimentos orgânicos, por alimentação com função nutracêutica, funcionais que apresentam substâncias com ação antioxidante e outras propriedades bioativas que podem ser encontradas nos vegetais (SIMONETTI; SIMONETTI; DE FARIÑA; 2021).

A alimentação é estudada há muito tempo, especialmente quanto à sua relação com a saúde humana. Na década de 1980, no Japão houve a definição do que seriam alimentos funcionais e nutracêuticos, e esses conceitos foram aperfeiçoados e difundidos pelo mundo. De maneira geral alimentos funcionais são alimentos que oferecem benefícios à saúde, não só pelos seus nutrientes essenciais, mas também por apresentar em sua composição, compostos bioativos que funcionalmente, contribuem para o bem-estar e saúde do indivíduo. Os nutracêuticos seriam alimentos com características funcionais que contêm compostos bioativos, de forma mais concentrada, e que podem ser consumidos, com a finalidade de melhorar a saúde, por agregar em maior quantidade,

substâncias que poderiam ser adquiridas de alimentos (MARQUES; DA COSTA, 2022; SANTOS et al., 2019.).

Evidenciando que a alimentação é mais do que apenas nutrição, o Guia Alimentar para a população brasileira (BRASIL, 2014) traz em seus princípios, a necessidade de respeitar a biodiversidade, a cultura e garantir um alimento nutritivo e seguro. Os indivíduos têm direitos que são essenciais à vida, um deles é o direito a uma alimentação adequada, ou seja, uma alimentação deve ter a capacidade de suprir as necessidades sociais do indivíduo considerando a quantidade, a qualidade, a diversidade e a segurança microbiológica e tecnológica dos alimentos que serão consumidos (CERVATO-MANCUSO; GOMES, SILVA; 2018).

Uma maneira de elevar a disponibilidade suficiente de alimentos de qualidade para a sociedade, significa necessariamente a diversificação da alimentação e dar valor a produção local. Dessa forma, pode-se destacar que as mudanças nos padrões de consumo são importantes, para que a conservação da agrobiodiversidade, autonomia e preservação da cultura local sejam promovidas conjuntamente. Elevar a visibilidade da importância das PANC para a sustentabilidade dos sistemas de produção de base ecológica deve ser uma finalidade das pesquisas realizadas nessa área (FONSECA et al., 2018).

Segundo o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o cultivo de hortaliças não convencionais se encontra restrito a agricultura familiar; dessa forma estudos nessa área se tornam necessários tanto para a manutenção, quanto para comprovação científica das propriedades benéficas desses vegetais. É importante ressaltar ainda que o Brasil apresenta uma elevada extensibilidade territorial, o que permite amplificar os estudos sobre as diferentes PANC, incentivando o trabalho de resgatar as práticas culturais de cultivo no sentido de evitar a extinção de algumas espécies (BRASIL, 2010).

2.2 A *Stachys byzantina* K. Koch (peixinho-da-horta)

A espécie vegetal *Stachys byzantina*, conhecida popularmente como peixinho-da-horta (lambarizinho, lambari-de-folha, orelha-de-coelho, orelha-de-lebre) é originária da Turquia, Ásia e Cáucaso; pode ser encontrada em regiões de clima ameno, com temperaturas entre 5 e 30 °C e é pertencente à classe *Magnoliatae*, subclasse *Asteridae*, família *Lamiaceae*. No Brasil, seu cultivo é observado nas

regiões Sul, Sudeste e Centro-Oeste. Trata-se de uma herbácea perene, atingindo cerca de 30 cm de altura e formando touceiras com dezenas de propágulos. Por ser uma planta rústica, apresenta poucas exigências, é bastante tolerante ao ataque de pragas e doenças. As folhas podem ser colhidas a partir de 60-70 dias, conforme elas atinjam tamanho superior a 8 cm, podendo alcançar facilmente 15 cm (BRASIL, 2010; LORENZI; KINUPP, 2014).

No Brasil, a utilização de plantas no tratamento de doenças é histórica sendo influenciada pelas culturas africana, indígena e europeia (DA CRUZ MONTEIRO; BRANDELLI, 2017). A *Stachys byzantina* apesar de não ter comprovações científicas confirmadas sobre sua função terapêutica é utilizada pela população para afecções dos pulmões, asma, bronquite, dores: na barriga, no corpo, na garganta, gripe, resfriado, próstata e pneumonia (BADKE et al., 2012). Em outra pesquisa realizada no Irã destaca-se que a mesma planta é usada baseada em evidência para atividade tripanocida e antimicrobiana, eficaz em tumores genitais, esclerose do baço, tumores inflamatórios e úlceras cancerígenas. Tem se destacado ainda pelo seu potencial antioxidante elevado (HAJIMEHDIPOOR et al., 2014; FLYNN et al., 2019) e significativa atividade antimicrobiana (SAEEDI et al., 2008).

Um dos pontos a serem avaliados na presente pesquisa diz respeito aos ácidos graxos. Em estudo realizado no Irã Khanavi (2003), realizou-se a extração de óleos essenciais da *Stachys byzantina* e foram encontrados vinte e quatro componentes, representando 88,5% do total do óleo, dos quais sesquiterpenos α -copaene (16,5%), espatulenol 16,1%), β -cariofileno (14,3%) e β -cubebene (12,6%) foram os componentes principais, sabe-se que o clima, o solo e outros fatores influenciam na composição química dos vegetais, portanto será possível uma comparação.

Em estudo realizado por Demirtas et al. (2013), avaliaram-se as atividades antiproliferativas de glicosídeos isolados de flavona e ácidos graxos de *Stachys byzantina*, em três linhagens celulares: C6, Hela e Vero. Recomendaram-se ensaios mais sofisticados com o intuito de identificar mais amplamente os aspectos de avaliação da capacidade antiproliferativa de compostos individuais, frações e ácidos graxos, bem como a eficácia e segurança da *Stachys byzantina*.

Segundo Silva et al. (2018) a *Stachys byzantina* exibiu maior nível fenólico total em comparação com outras espécies de plantas não convencionais, obteve também valores mais baixos para os níveis de vitamina C, e manteve-se em nível

intermediário de atividade antioxidante. No estudo citado, o vegetal não convencional estudado obteve níveis nutricionais de vitaminas, minerais e fibras superiores às médias descritas para a constituição nutricional de vegetais usuais da alimentação humana.

Houve também comprovação das propriedades nutricionais presentes nas folhas de *Stachys byzantina*, destacando-se os teores de carboidratos, fibras, proteínas, potássio e ferro, o que contribuiria para a ingestão diária de aminoácidos essenciais, e que elevaria a qualidade nutricional da alimentação dos consumidores desta planta (AZEVEDO, 2018).

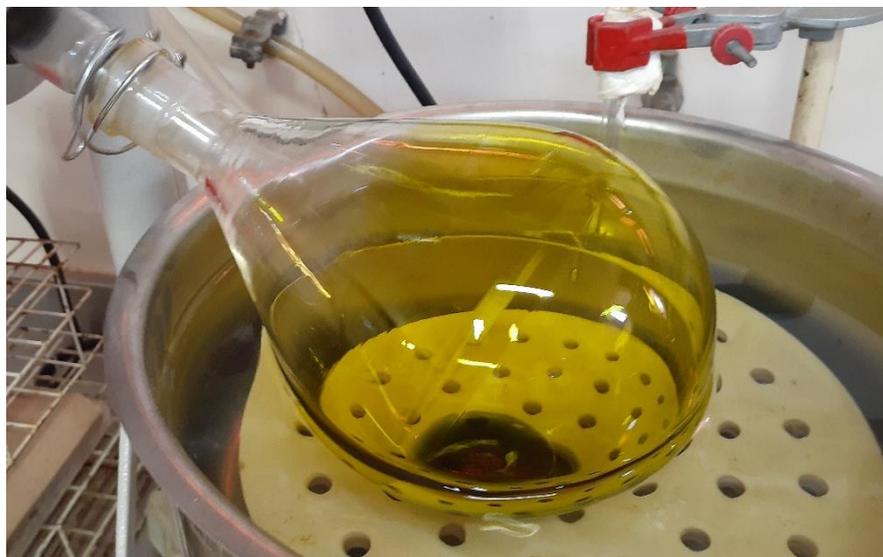
O estudo sugere que a *Stachys byzantina* seja utilizada como composto para o desenvolvimento de novos produtos alimentares, ofertando aos produtores que a cultivam mais formas de desenvolvimento econômico. Em relação a atividade antimicrobiana e eficiência antioxidante, no extrato 50% de metanol e 70% de acetona de folhas de *Stachys byzantina*, foi demonstrado que esses extratos apresentaram-se como um aditivo natural propício para elevar o tempo de prateleira de itens alimentícios, segundo o autor. Não foi encontrada toxicidade na planta estudada (AZEVEDO, 2018).

Investigar a presença de ácidos graxos e os percentuais presentes nas folhas de *Stachys byzantina* se torna importante, visto que há comprovações que o consumo deles na alimentação exerce numerosos efeitos sobre diversos aspectos fisiológicos e do metabolismo. Entre eles: influenciar nas chances de evitar o desenvolvimento de doenças cardiovasculares, tais como melhoria da função autonômica, antiarrítmico, diminuição da agregação plaquetária e da pressão arterial, melhora da função endotelial, estabilização da placa de ateroma e de triglicérides (SANTOS et al., 2013).

No presente estudo será extraído e analisado o óleo bruto das folhas de *Stachys byzantina*, importante frisar que é diferente de óleo essencial e óleo refinado. Óleo essencial é, por definição, o produto obtido por destilação, hidrodestilação ou destilação por arrastamento de vapor, de uma planta ou das suas partes, ou por um processo mecânico, sem envolvimento de calor, que decorre por prensagem, ou picotagem, do fruto e seu arrastamento pela água. Uma vez extraído, o óleo essencial é separado da fase aquosa por um processo que não envolva alteração da sua composição, como, por exemplo, a centrifugação (Council of Europe, 2010). A definição de óleos refinados consiste em: óleos vegetais

submetidos a processos físicos ou químicos para retirada de fosfolipídeos, esteróis, tocoferóis, hidrocarbonetos, pigmentos e outros componentes não glicéricos (ANVISA, 2020).

Figura 1: Concentração em rotaevaporador do óleo bruto da *Stachys byzantina*

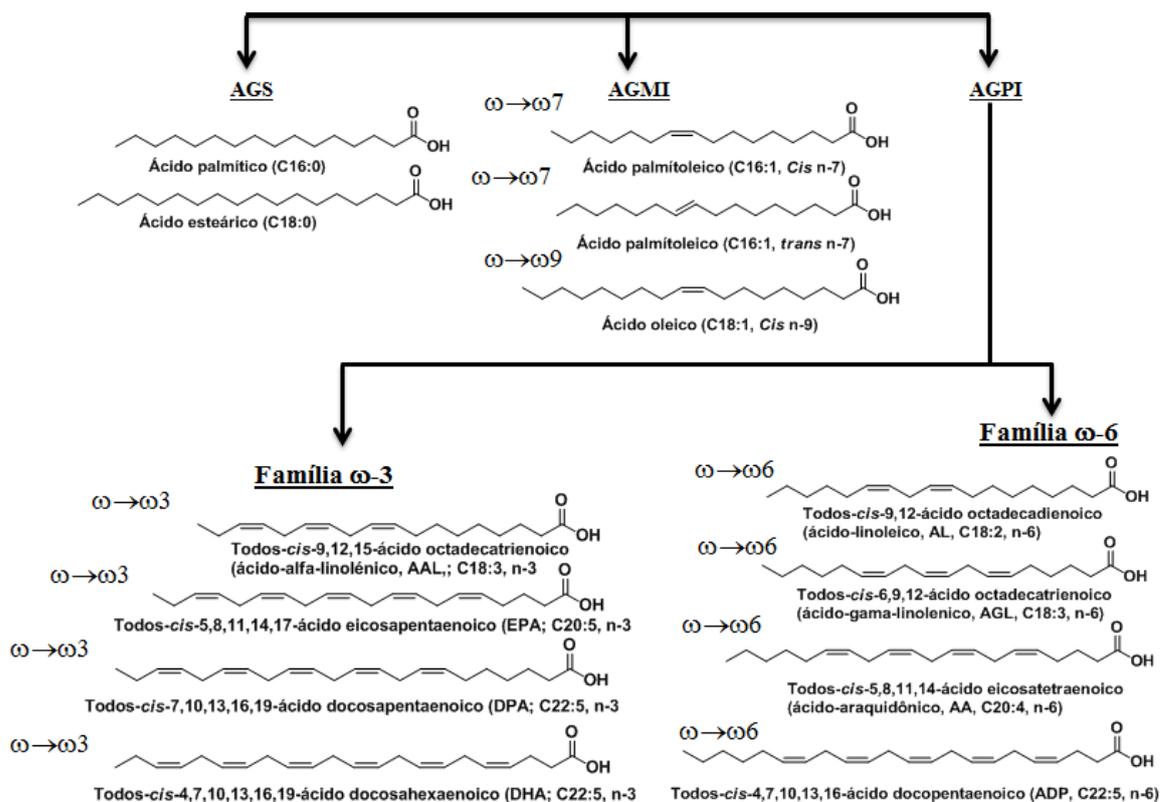


2.3 Ácidos graxos

Ácidos graxos são os principais componentes dos lipídeos, sua composição contém uma cadeia alifática e um grupo ácido carboxílico. A maior parte dos ácidos graxos de ocorrência natural possui número par de carbonos em uma cadeia linear, devido ao processo biológico de alongamento da cadeia, em que dois carbonos são adicionados a cada vez. Na natureza a maioria dos AG apresenta entre 14 e 24 carbonos. Os AG habitualmente são classificados como saturados e insaturados, sendo que os insaturados apresentam ligações duplas (DAMODARAN; PARKIN, 2019).

Com a presença de compostos benéficos para a saúde em óleos, seu consumo está em crescente demanda devido ao interesse dos consumidores em prevenir doenças e promover saúde através da melhora da dieta. Esta composição benéfica abarca fenólicos, carotenoides, tocoferóis, antioxidantes e composição especial em ácidos graxos, como alto conteúdo de mono e poli-insaturados (PEREIRA, 2017; SANTOS et al., 2019). Determinados ácidos graxos insaturados causam efeitos especiais no organismo vivo e são denominados de ácidos graxos

Figura 3 - Estrutura dos principais ácidos graxos encontrados na natureza.



Fonte: Adaptado de ELST *et al.* (2014) e SAINI; KEUM (2018).

Os Ácidos Graxos Saturados (AGS) são componentes especialmente encontrados nas gorduras animais, manteiga, laticínios, ovos, carne bovina, banha, vísceras, óleo de coco, palma e em menores porcentagens nos demais óleos vegetais (BOATENG *et al.* 2016).

Os Ácidos Graxos Monoinsaturados (AGMI) apresentam-se na composição de produtos de origem animal (carne e laticínios) e em maior porcentagem nos óleos vegetais, destacando-se o ácido graxo oleico, encontrado em óleos de oliva, canola e amendoim (ORSAVOVA *et al.* 2015; BRIGGS; PETERSEN; KRIS-ETHERTON, 2017).

Por Ácidos Graxos Poli-insaturados (AGPI) essenciais entendem-se os AG que não podem ser sintetizados pelo organismo humano, o que faz com que eles precisem ser ingeridos através da alimentação. As famílias que os constituem são a do ácido α -linolênico (AAL) (ω -3) e ácido linoleico (AL) (ω -6) (SAINI; KEUM, 2018). Os AGPI podem ser encontrados nos óleos de linhaça, canola, soja, girassol e milho e nas folhas jovens de alface e moringa (SAINI; SHETTY; GIRIDHAR, 2014).

Para o corpo humano, os ácidos linoléico (18:2, n-6, AL) e alfa-linolênico (18:3, n-3, AAL) desempenham funções essenciais em condições normais como manter as membranas celulares, as funções cerebrais e a transmissão de impulsos nervosos. Eles também fazem parte da transferência do oxigênio atmosférico para o plasma sanguíneo, da síntese da hemoglobina e da divisão celular, são nomeados como essenciais por não serem sintetizados pelo organismo a partir dos ácidos graxos provenientes da síntese (DA SILVA, 2018; SAINI et al., 2021).

A concorrência entre os ácidos da série n-6 com os da n-3 nos processos fisiológicos para produção de eicosanoides para evitar doenças crônicas e visando a manutenção da saúde levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a recomendar a proporção em razão que se deve consumir w6:w3 até 5:1, entretanto, as dietas em países ocidentais estão em desacordo dessa recomendação pelo alto consumo de produtos industrializados ricos em ácidos graxos Ômega 6, que é essencial para o organismo, mas que em altas concentrações tendem a gerar um quadro de inflamação crônica no indivíduo. Dito isso os indivíduos devem ser encorajados a consumir mais alimentos ricos em n-3, como vegetais de folhas verdes, legumes, peixes e outros frutos do mar (VAN DAEL, 2021; BENJAMIN et al., 2019, WHO e FAO, 1995).

2.4 Ensaios de citotoxicidade

Importantes para a avaliação de agentes antineoplásicos, os testes de citotoxicidade *in vitro* em cultura de células permitem verificar se houve inibição da proliferação de células neoplásicas. São uma ferramenta importante durante a fase de screening e têm abreviado os ensaios *in vivo* em animais. São utilizados também como métodos alternativos aos testes farmacológicos em órgãos isolados (JAIN; KHATANA; VIJAYVERGIA, 2019).

São inúmeras linhagens neoplásicas que podem ser utilizadas no estudo de compostos com atividades anticâncer, os efeitos são avaliados por parâmetros que incluem, desde a morte celular, até a alteração de seu metabolismo (FRESHNEY et al., 1994; KEAWPRADUB et al., 1999).

Diversas são as vantagens para utilização do modelo de culturas de células neoplásicas: condições controladas para o estudo das reações celulares, teste com amostras em concentração conhecida, no screening de drogas onde se fazem

muitas replicatas e se testam inúmeros compostos, a cultura de células é economicamente menos custosa que os testes *in vivo*, reduzindo o uso de animais em ensaios *in vivo*. (CINGI et al., 1991).

2.5 Propriedade antimicrobiana

Apesar dos antibióticos permitirem o tratamento de infecções antes mortais, os microrganismos desenvolveram resistência, o que levou a uma fase de resistência antimicrobiana. Por conseguinte, as opções de tratamento antimicrobiano tornaram-se limitadas e a necessidade de melhores antimicrobianos mais evidentes. A busca de novos antimicrobianos, materiais de origem natural com propriedades antimicrobianas (JORAHOLMEN et al., 2020)

O estudo realizado por Du et al. (2011) indicou correlação expressiva entre atividade antimicrobiana e compostos polifenólicos totais considerados antioxidantes naturais, especialmente com a eficácia contra alguns agentes patológicos gastrointestinais.

Em Azevedo (2018), a atividade inibitória mínima do extrato metanólico de peixinho-da-horta foi maior contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, seguida por *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*.

Compostos fenólicos apresentam efeitos antimicrobianos. Assim, extratos de frutas e vegetais têm sido incorporados em diversas formulações alimentares, inclusive suplementos alimentares, películas e revestimentos comestíveis, tanto por suas propriedades antioxidantes quanto por sua eficácia contra alguns patógenos de origem alimentar, por seus efeitos saudáveis, mas também como conservantes de alimentos (Du et al., 2011; Elfalleh et al., 2011).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Determinar o perfil de ácidos graxos do óleo bruto das folhas *Stachys byzantina* e sua atividade anticâncer e antimicrobiana.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a composição centesimal das folhas de peixinho da horta
- b) Determinar o perfil de ácidos graxos do óleo das folhas do peixinho;
- c) Analisar a qualidade do óleo por meio da UV-Vis;
- d) Verificar a atividade antiproliferativa em linhagens neoplásicas;
- e) Analisar a atividade antimicrobiana dos extratos etanólico, hidroetanólico e hidracetônico;

4. METODOLOGIA

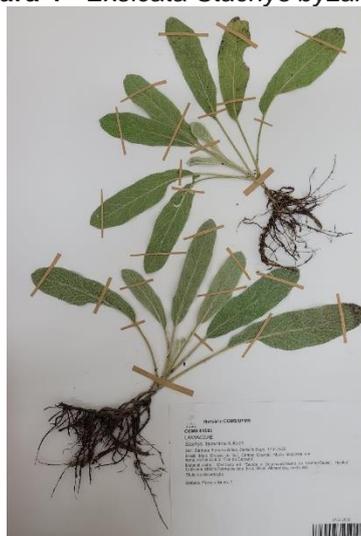
4.1 Tipo, local e período da pesquisa

A pesquisa foi realizada nos laboratórios de Físico-química, Biologia molecular e Culturas celulares e Unidade de Tecnologia em Alimentos (UNITAL), da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição (FACFAN), e no Instituto de Química (INQUI), todos localizados no *campus* de Campo Grande, na UFMS. A pesquisa teve caráter experimental, foi quantitativa e descritiva, pois buscou a quantificação e caracterização da *Stachys byzantina* e avaliação do seu potencial antiproliferativo e antimicrobiano.

4.2 Matéria prima

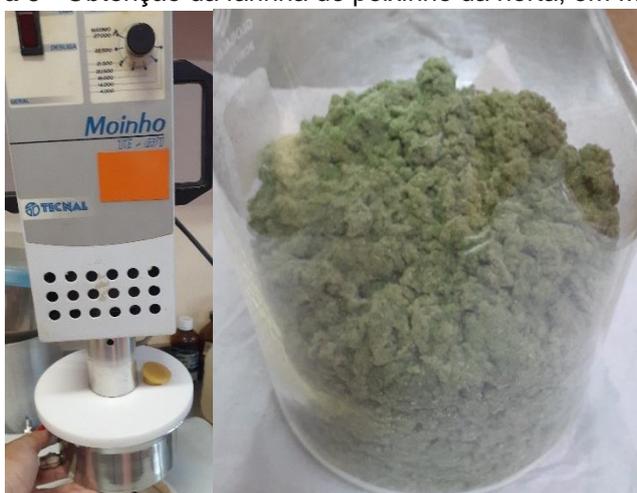
As folhas do peixinho foram coletadas em Campo Grande, Mato Grosso do Sul na Horta Flor do Cerrado (coordenadas geográficas: -20.519548, -54.749163) As exsiccatas foram levadas ao Laboratório de Botânica da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para identificação da espécie (Figura 4).

Figura 4 - Exsicata *Stachys byzantina*.



As folhas foram lavadas em água corrente e sanitizadas com hipoclorito a uma concentração de 200ppm. Posteriormente foram levadas para estufa com circulação de ar controlada a 40 °C por 48 horas. Após secagem, as folhas foram moídas em moinho TE-631(Tecnal), obtendo-se uma farinha que foi colocada em frasco âmbar hermético e conservada em congelador a -18 °C, para as análises posteriores.

Figura 5 - Obtenção da farinha de peixinho da horta, em Moinho.



4.3 Composição Centesimal das folhas de *Stachys byzantina*

4.3.1 Determinação de Umidade

Método de perda por dessecação (umidade) – Secagem direta em estufa a 105° C. As amostras foram pesadas em triplicata aproximadamente 4 g, em cápsula

de porcelana, previamente tarada. Aquecida durante 3 horas e resfriadas em um dessecador até a temperatura ambiente. Repetiu-se a operação de aquecimento e resfriamento até o peso constante.

Cálculo:

$$\frac{100 \times N}{p} = \text{umidade ou substâncias voláteis a } 105^{\circ} \text{ C por cento m/m}$$

N = nº de g em umidade (perda de massa em g)

P = nº de g da amostra

4.3.2 Determinação de Cinzas

Método: Resíduo por incineração – Cinzas. Amostra foi pesada, em triplicata, em alíquotas de 3 g a 5 g em cadinho de porcelana, previamente aquecida em mufla a 550°C, resfriado em dessecador até a temperatura ambiente e pesado. Os cadinhos com amostras foram levados à mufla e incinerados a 550°C. Após a obtenção de cinzas em mufla, os cadinhos foram resfriados em dessecador até a temperatura ambiente e pesados.

Cálculo:

$$\frac{100 \times N}{p} = \text{cinzas por cento (m/m)}$$

N = nº de g de cinzas

P = nº de g da amostra

4.3.3 Determinação de Proteínas

O teor de proteínas foi determinado pelo Método de Kjeldahl, em triplicata. Pesou-se 0,1 g da amostra em papel de seda. Transferiu-se para os tubos (papel+amostra). Foi adicionado 2 gramas da mistura catalítica e 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. A amostra foi aquecida na capela, até que tenha sido realizada a etapa de digestão. Após esfriar foi realizada a destilação e posteriormente a titulação.

Cálculo:

$$\frac{(V_a - V_b) \times F \times 0,1 \times 0,014 \times 100}{P_a} = NT$$

NT: teor de nitrogênio total na amostra, em porcentagem

Va: Volume de HCl gasto na titulação da amostra, em mL

Vb: Volume de HCl gasto na titulação do branco, em mL

F: Fator de correção do HCl

Pa: massa da amostra, em gramas.

$$NTxFn = PB$$

PB: teor de proteína bruta na amostra, em porcentagem

Fn: 5,75

4.3.4 Determinação de Lipídios

Para a determinação do teor de lipídios foi utilizado o método de extração direta em Soxhlet, o experimento foi feito em triplicata.

Cálculo:

$$\frac{100xN}{P} = \text{Lipídios ou extrato etéreo por cento m/m}$$

N = n° de g lipídios

P = n° de g da amostra

4.3.5 Determinação de Carboidratos

A determinação de carboidratos foi feita por diferença.

$$Cb = 100 - \%cinzas - \%lipídios - \%proteínas$$

4.4 Extração do óleo

A extração do óleo da farinha integral das folhas foi realizada por maceração estática e utilizando hexano como solvente. A cada 72 horas, o sobrenadante formado foi recolhido para um frasco âmbar e conservado no ambiente escuro e a extração continuou até o sobrenadante tornar-se incolor. O óleo bruto foi acondicionado em frasco âmbar em freezer a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ para análises.

Após o processo de extração, a mistura solvente e o óleo foram separados em um evaporador rotativo em pressão reduzida e o óleo extraído foi pesado (massa N) para calcular o rendimento extrativo (RE).

Cálculo do teor de óleo nas folhas (rendimento extrativo – RE):

$$RE = \frac{100xN}{P}$$

Onde:

N = massa de óleo extraído (g)

P = massa da amostra (folhas trituradas) (g)

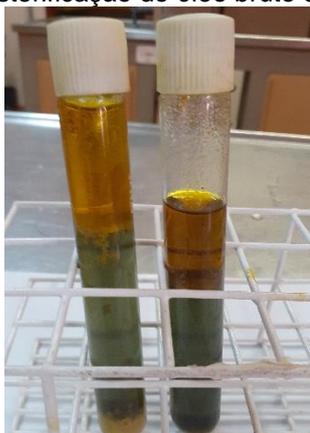
4.5 Perfil de ácidos graxos

Para determinação da composição em ácidos graxos do óleo de peixinho extraído, realizou-se a esterificação dos ácidos de acordo com a metodologia de Maia e Rodriguez-Amaya (1993).

Após metilação dos ácidos graxos, as amostras foram analisadas por cromatografia em fase gasosa acoplada a espectrometria de massa (CG-EM).

As amostras dos ésteres (1mL) foram injetadas através de um amostrador automático do Shimadzu AOC-20s + i na coluna Stabiwax (30 m de comprimento, 0,25 mm d.i., de espessura). A temperatura interna do forno foi programada a partir de 60 °C (2 min) e em seguida aumentada a 10 °C min⁻¹ para 200 °C (10 min), e aumentado em 5 °C min⁻¹ para 240 °C (15 min). A temperatura de injeção foi 250 °C. O gás hélio foi utilizado para o arraste.

Figura 6 - Esterificação do óleo bruto da *Stachys byzantina*.



4.5 Análise do óleo bruto quanto às suas características

4.5.1 Determinação do índice de acidez

Para determinação do índice de acidez foi utilizada metodologia de acordo com Instituto Adolfo Lutz (2008).

Foram utilizados 2,0 g de óleo e 25 mL de mistura de solvente éter-neutro com etanol na proporção de 2:1, sendo esta solução titulada com KOH 0,1M usando 1 mL de fenolftaleína como indicador até a coloração rosa persistir por 30 segundos. O índice de acidez foi determinado seguindo a equação (1):

$$\begin{aligned} & \text{Índice de acidez (mgKOH/g óleo)} \\ & = \frac{56,1CV}{\text{Peso do óleo}} \end{aligned} \quad (1)$$

Onde:

C–Concentração de KOH usada;

V–Volume de KOH usado;

56,1–Peso molecular de KOH.

4.5.2 Determinação do índice do peróxido

A determinação do índice do peróxido foi realizada segundo *American Oil Chemists' Society* (AOCS, 1990).

Foram pesados 5,0 g de óleo, 10 mL de clorofórmio e 30 mL de ácido acético (3:2), agitando-se até a mistura se dissolver. Posteriormente adicionou-se 0,5 mL de solução de iodeto de potássio (KI) e em seguida foram adicionados 30 mL de água destilada e titulados com tiosulfato de sódio a 0,1 N. A determinação do branco foi realizada sem adição do óleo. O índice de peróxido foi calculado de acordo com a equação (2):

$$\begin{aligned} & \text{Índice de Peróxido (mEq/kg óleo)} \\ & = \frac{(A - B)NF1000}{\text{Peso do óleo}} \end{aligned} \quad (2)$$

Onde:

A–Volume de tiosulfato de sódio usado na titulação da amostra;

B–Volume de tiosulfato de sódio usado na titulação do branco;

N–Normalidade de tiosulfato do sódio;

F–Fator da solução de tiosulfato de sódio.

4.5.3 Determinação do índice de iodo por cálculo

O índice de iodo determinado por cálculo aplica-se a análise de triglicerídeos e de ácidos graxos livres e seus produtos hidrogenados. Este método determina o índice de iodo de óleos comestíveis diretamente da composição de ácidos graxos insaturados obtidos a partir da análise por cromatografia em fase gasosa.

Procedimento – Após a determinação da composição de ácidos graxos da amostra analisada por cromatografia em fase gasosa.

Cálculos

$(\% \text{ ácido palmitoleico} \times 0,950) + (\% \text{ ácido oleico} \times 0,860) + (\% \text{ ácido linoleico} \times 1,732) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2,616) + (\% \text{ ácido gadoleico} \times 0,785) + (\% \text{ ácido erúxico} \times 0,723) = \text{índice de iodo dos triglicerídeos}$

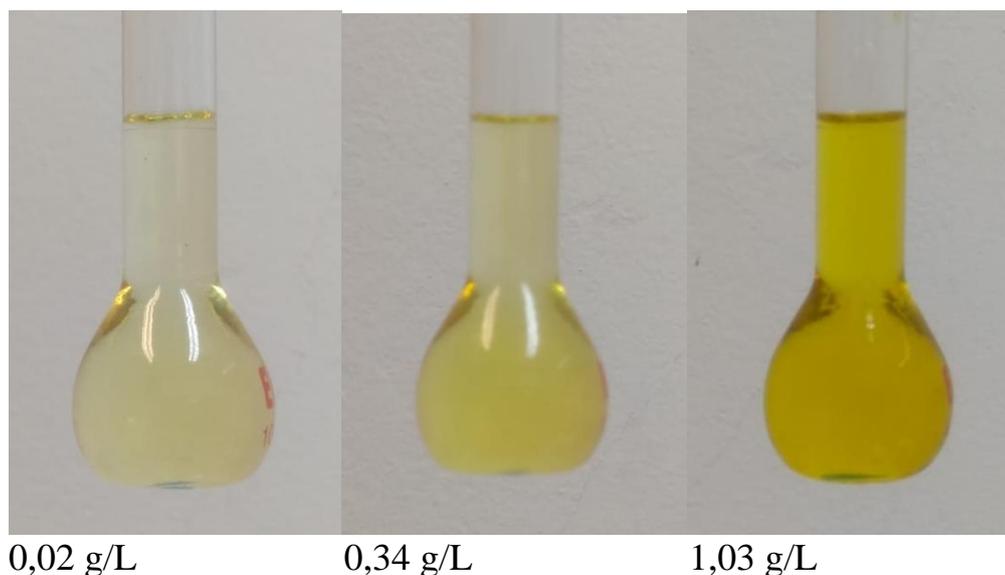
$(\% \text{ ácido palmitoleico} \times 0,990) + (\% \text{ ácido oleico} \times 0,8986) + (\% \text{ ácido linoleico} \times 1,810) + (\% \text{ ácido linolênico} \times 2,735) + (\% \text{ ácido gadoleico} \times 0,8175) + (\% \text{ ácido erúxico} \times 0,7497) = \text{índice de iodo dos ácidos graxos livres}$

Nota: para óleos com conteúdo de matéria insaponificável superior a 0,5% (ex.: óleos de peixe), o resultado tende a ser inferior ao determinado pelo método de Wijs.

4.5.4 Análise óptica dos óleos: absorção UV-Vis e matriz de fluorescência de emissão-excitação

Os espectros de absorção UV-Vis foram coletados em um espectrômetro LAMBDA 265 UV-Vis (PerkinElmer®) entre 200 e 800nm, utilizando uma cubeta de quartzo com 10mm de caminho óptico e capacidade de 3,5 mL. A amostra de extrato foi diluída em hexano grau espectroscópico (Vetec® > 99%) obtendo 3 concentrações distintas, 0,02 g/L, 0,34 g/L and 1,03 g/L (Figura 7). Os espectros de absorção UV-Vis foram coletados na faixa de 200-750 nm. Medições de fluorescência dos óleos foram realizadas em um espectrofluorômetro (FS-2, Scinco, Coréia). As matrizes de emissão-excitação da fluorescência foram obtidas excitando as amostras na faixa de 250 a 550 nm e recolhendo a emissão entre 270 e 750 nm. Todas as medições ópticas foram realizadas à temperatura ambiente.

Figura 7 - Diluições do óleo bruto para análise cromatográfica UV-vis.



4.6 Obtenção dos Extratos para atividade antimicrobiana e anticâncer

As folhas de peixinho da horta (*Stachys byzantina*) foram secas em estufa circulante por 48h à 37° C, após a secagem foram moídas, formando uma farinha. Com a farinha foram elaborados cinco extratos com quatro solventes diferente sendo eles: extrato etanólico, extrato hidroetanólico (30:70), extrato hidroacetônico (20:80), extrato diclorometânico e extrato hexânico.

Em diferentes solventes as farinhas de peixinho foram maceradas separadamente à exaustão durante 15 dias à temperatura refrigerada de 20±5 °C, sendo que o solvente foi trocado e filtrado com a utilização de gases estéreis a cada 5 dias.

Após esse período, os solventes foram evaporados, para concentração dos extratos com a utilização de rotaevaporador (Rotoevaporador R-3, BUCHI) a temperatura de 35±2 °C para eliminação total dos solventes, foram suspensos e mantidos em frasco âmbar, ao final todos os extratos foram armazenados sob temperatura congelamento de -18 °C, conforme a FARMACOPÉIA BRASILEIRA (2010) e adaptações de Bittencourt-Junior et al. (2012) e Lima e Coelho (2013).

4.7 Avaliação da atividade anticâncer *in vitro* do óleo da *Stachys byzantina*

Foram utilizadas as seguintes linhagens de células neoplásicas: B16-F10 (ATCC - CRL-6475, melanoma murino), MCF7 (ATCC – HTB-22, carcinoma de mama), 786-0 (ATCC - CRL-1932, carcinoma de rim) e HUVEC (células endoteliais de cordão umbilical de neonatos).

Também foi utilizada uma linhagem de células normais, NIH/3T3 (ATCC–CRL 1658, fibroblasto murino) adquirida do Banco de Células do Rio de Janeiro para a determinação do Índice de Seletividade (BÉZIVIN et al., 2004; HOUGHTON et al., 2007).

As células, que estavam armazenadas em nitrogênio líquido (-196 °C), foram descongeladas em banho-maria a 37° C e transferidas para um tubo cônico de 15mL, contendo 9mL de meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) ou RPMI (Roswell Park Memorial Institute), ambos contendo os antibióticos Penicilina e Estreptomicina (1%) e Soro Fetal Bovino (SFB) (10%). Este tubo foi centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm. Após, aspirou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em 5mL de meio. A suspensão celular foi então, transferida para frascos de cultura de 25cm² e incubados a 37° C em atmosfera úmida com 5% de CO₂ até formação da monocamada com aproximadamente 80% de confluência.

Dando continuidade, aspirou-se o meio de cultura, ficando as células aderidas no fundo do frasco. As células foram desprendidas com a adição de 0,5 mL de tripsina-EDTA (0,25% + EDTA 1 mM) em tampão PBS, pH 7,4. A suspensão de células foi transferida para outro tubo cônico de 15mL contendo meio completo (meio, antibióticos e SFB a 10%), em um volume 3 vezes maior do que aquele usado de tripsina a fim de neutralizar a mesma. O passo seguinte foi a centrifugação por 4 minutos a 1000 rpm, aspirou-se o sobrenadante e o pellet foi ressuscitado em meio completo, sendo a suspensão usada no processo de contagem celular.

4.7.1 Preparo das amostras-teste

Os extratos e o óleo bruto do peixinho foram diluídos em Dimetilsulfóxido (DMSO) na concentração de 0,1 g/mL. Para adicioná-los nas células, foi realizada diluição seriada em meio de cultura, sendo utilizadas as concentrações de 0,25, 2,5, 25 e 250 µg/mL em triplicata (FIGUEIREDO et al., 2011). A maior

concentração de DMSO utilizada foi de 0,25%, o que não altera a viabilidade celular. Como controle positivo utilizou-se a Doxorubicina (Libbs®) em concentrações dez vezes menor (10x) de 0,025, 0,25, 2,5 e 25 µg/mL.

4.7.2 Testes de citotoxicidade

O método colorimétrico utilizado para avaliação da atividade antitumoral foi o da sulforrodamina B (SRB) descrito por Skehan *et al.* (1990).

Após a obtenção do número adequado de células, elas foram desprendidas dos frascos de manutenção (garrafas) por ação da tripsina-EDTA (procedimento inicial realizado da mesma forma descrita anteriormente para o repique) e transferidas para um tubo cônico com meio completo (em um volume três vezes maior do volume da tripsina) e centrifugado por 4 minutos a 1000 rpm.

Ao *pellet* foram adicionados 2 (dois) mL de meio de cultura e desta suspensão retirou-se a alíquota para diluir em corante (azul de tripan 1:4) que evidencia as células não viáveis, as quais foram excluídas da contagem. Nesta etapa utilizou-se um contador manual (Câmara de Neubauer) para a obtenção da suspensão de células, suficiente para que fosse feita a inoculação de 7.500 células por cavidade em uma placa teste de 96 poços.

Após a contagem celular, ocorreu o preparo da placa T0 (Tempo Zero) e da placa teste. À placa T0 foi adicionado em triplicata a suspensão celular de cada linhagem e triplicata do meio de cultura. A T0 foi então incubada e após 24 horas foi realizado o procedimento de coloração (metodologia descrita abaixo) por adição de sulforrodamina B (SRB), um corante que possui afinidade pelas proteínas das células (SKEHAN *et al.*, 1990). A placa T0 é utilizada como parâmetro do ponto inicial do experimento, após a leitura desta é possível mensurar a densidade de células viáveis no momento em que foram adicionadas as amostras na placa teste. Na placa Teste também foi adicionada a suspensão celular, após a incubação inicial de 24 horas foram adicionadas as amostras-teste em triplicata, nas concentrações de 0,25 - 2,5 - 25 e 250 µg/mL, sendo esta placa novamente incubada por 48hs. A placa teste continha ainda, o branco de cada concentração da amostra-teste, o controle negativo (células mais 100µL de meio) e controle positivo doxorrubicina (0,025 - 0,25 - 2,5 e 25 µg/mL). Após o período de incubação (48h) foi realizado também o procedimento de coloração com SRB.

O procedimento de coloração é realizado da seguinte forma: O sobrenadante das cavidades das placas foi aspirado, permanecendo apenas as células nas cavidades. Adicionaram-se 100µL de ácido tricloroacético (TCA) 20% em cada cavidade, a fim de fixar as células viáveis, e então, as placas mantidas em repouso por 30 minutos a 4 °C ao abrigo da luz. Em seguida o sobrenadante foi descartado e as placas lavadas em água corrente e depois de secas, foram adicionadas 50µL de SRB (Sigma, USA) 0,1% diluído em ácido acético 1%. Novamente as placas foram mantidas em repouso por 30 minutos, em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após, as placas foram lavadas 5 vezes com ácido acético 1% para retirar o excesso de corante livre. A seguir adicionou-se à placa seca 100µL de tampão Trizma Base (10mM, pH 10,5) (Sigma, USA), para que ocorra a solubilização do corante ligado às proteínas das células fixadas.

A leitura das absorbâncias nos dois métodos foi feita no comprimento de onda de 540nm em leitor de microplaca Molecular Devices SpectraMax 190®.

Foram obtidas leituras de absorbâncias em triplicata; tempo zero (T₀, início da incubação), e após 48 horas tanto para o controle negativo (CN) quanto para a placa contendo as amostras-teste (T) em cada uma das quatro concentrações. A porcentagem de crescimento celular (média e desvio padrão) foi determinada usando a equação $100 \times [(T - T_0) / C - T_0]$. Um efeito citostático foi observado quando $T \geq T_0$, enquanto um efeito citocida ocorreu quando $T < T_0$ (MONKS *et al.* 1991). A concentração que inibiu 50% do crescimento celular (GI₅₀) foi determinada por análise de regressão não linear em programa para gráficos e análises de dados (*Origin* Versão 6.0). Os experimentos foram realizados em triplicata (n=3) na linhagem de células B16-F10 para a determinação da média e desvio padrão da GI₅₀, nas demais linhagens celulares foi realizado um experimento com concentrações em triplicata.

4.8 Avaliação da atividade antimicrobiana do óleo da *Stachys byzantina*

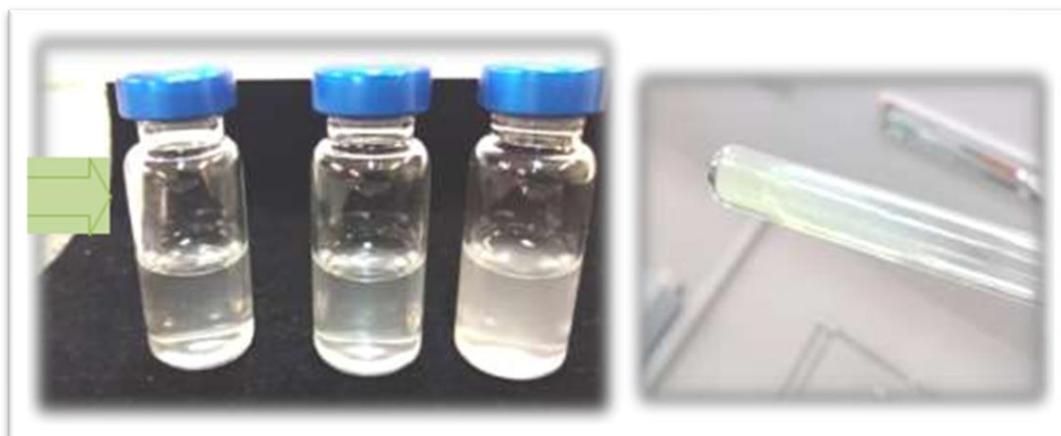
O experimento foi realizado no laboratório de Microbiologia de Alimentos da Faculdade de Ciências Farmacêutica, Alimentos e Nutrição (Facfan) da Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS), em Campo Grande, MS.

Os microrganismos de referência (rastreadáveis a *American Type Culture Collection*- ATCC) a serem explorados para a pesquisa foram: *Salmonella*

enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans* foram fornecidos pelo INCQS/FIOCRUZ (Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde, sediada no Rio de Janeiro/RJ) para o Laboratório de Microbiologia de Alimentos da FacFAN da UFMS, em Campo Grande – MS. Foram empregadas as cepas de *Salmonella* enteritidis, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* e *Candida albicans*. Todas as bactérias foram semeadas em placas de Petri contendo meio de cultura de contagem padrão. As placas com repique de cepa de *Salmonella* enteritidis, *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus* e *Bacillus cereus* foram incubadas em estufa, a 35°C/24h e as com repique de cepa de *Listeria monocytogenes* a 30°C/24h. O fungo *Candida albicans* foi semeado em placa de petri contendo meio de cultura ADB. As placas com repique da cepa foram incubadas em estufa, a 26° C/48h.

Após o período de ativação das cepas, foram preparadas suspensões contendo 2 a 3 colônias dos respectivos microrganismos, em tubos de ensaio contendo 10 mL de solução fisiológica 0,9% (m/v), até se atingir uma turvação compatível ao padrão 0,5 da escala de Mac Farland (PROBAC DO BRASIL), correspondente a uma concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL, essa suspensão foi utilizada para realização do teste de difusão em disco (Figura 8).

Figura 8 - Ativação e Preparação das suspensões correspondente a concentração de $1,5 \times 10^8$ UFC/mL.



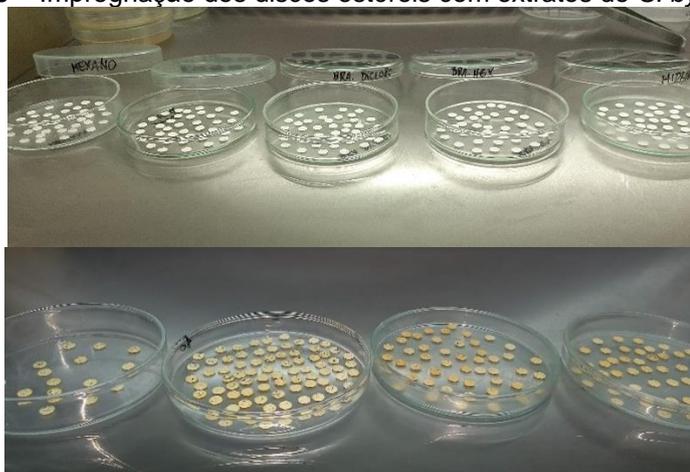
4.8.1 Teste de difusão em disco

As análises de determinação da atividade antimicrobiana *in vitro* seguiram o modelo proposto por Sá et al. (2011), em triplicata, que consiste em preparar o inóculo usando colônias mantidas em Ágar Muller-Hunton (MH) foram usadas para obtenção de suspensão bacteriana com turbidez equivalente a 0,5 na escala de MacFarland.

A técnica de difusão em ágar seguiu os protocolos descritos CLSI (2005), onde discos comerciais estéreis de papel de filtro com 6 mm de diâmetro da marca CECON/SP foram impregnando 10 µL dos extratos de peixinho da horta.

Os testes foram conduzidos com uso de discos de papel de filtro estéreis em placas estéril, impregnando 10 µL 3 extratos de peixinho da horta. (Fig. 9).

Figura 9 – Impregnação dos discos estéreis com extratos de *S. byzantina*.



Os mesmos foram mantidos em capela de exaustão de fluxo laminar para a secagem e em seguida foram distribuídos e pressionados sobre uma placa de Petri com o ágar Mueller-Hinton (MERCK) anteriormente inoculado com microrganismos por espalhamento em superfície. Foram mantidas uma distância de 40 mm entre os discos para impedir intervenção entre os possíveis halos de inibição. O teste controle negativo foi efetuado com disco branco.

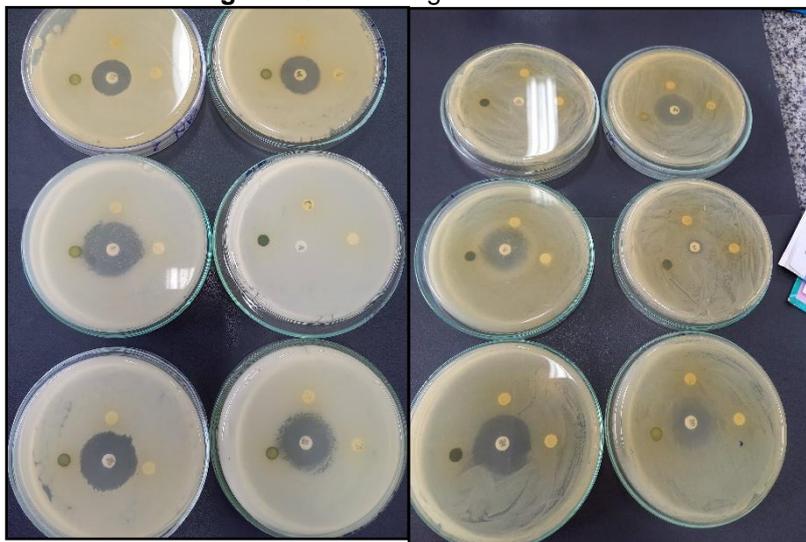
Teste de antibiograma com disco comercial de antibiótico cloranfenicol 30 µg, vancomicina 30 µg, gentamicina 10 µg, tetraciclina 30 µg, penicilina g 10 UI e azitromicina 15 µg.

Posteriormente, as placas de Petri foram incubadas invertidas a temperatura 35 °C/24h para as cepas de *Salmonella* Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e de *Escherichia coli* e na a temperatura 30 °C/24h para as cepas de *Listeria monocytogenes* e *Bacillus cereus*.

Após o período de incubação de 24 horas, foi observada a existência ou não de halos de inibição dos discos, e para condução das medidas do diâmetro dos halos de inibição foi realizada a leitura com auxílio de um paquímetro (Vicare-modelo 09.0001).

Os resultados das medidas foram expressos em milímetros (mm) pela média do diâmetro dos halos de inibição formados ao redor dos discos nas três repetições (BARRY; THORNSBERRY, 1991) (Fig. 10).

Figura 10 – Antibiograma de *E. coli*.



Foi baseada na técnica de difusão em ágar empregando os discos comerciais de papel de filtro com 6 mm de diâmetro estéreis (CECON - SP) (BAUER et al., 1966, CLSI, 2005).

4.9 Organização e análise dos dados

Um banco de dados utilizando o software Microsoft Excel 2010 foi elaborado, para a inclusão dos itens que compõem cada instrumento de coleta de dados, o que permitiu a emissão de relatórios segundo as variáveis de interesse, sendo estas processadas e analisadas com utilização da estatística.

Para o ensaio de atividade anticâncer *in vitro*, a dose que inibe 50% do crescimento celular (GI50) foi determinada em programa para gráficos e análises de dados (Origin Versão 6.0).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição centesimal das folhas de *Stachys byzantina*

A composição centesimal das folhas de *Stachys byzantina* está apresentada na Tabela 1. O teor de umidade foi de 85,40%, o que pode estar relacionado ao clima, estação e horário da colheita. Os valores de proteínas, em torno de 16,24 e cinzas , 9,28% em base seca, são bastante animadores e compatíveis com amostras de outros locais do Brasil, por se tratar de uma das PANC mais consumidas e palatáveis, esses resultados contribuem positivamente para promoção de uma alimentação nutritiva e biodiversa.

Tabela 1 – Composição centesimal das folhas de peixinho-da-horta (*Stachys byzantina*).

Folhas de <i>Stachys byzantina</i>	
Umidade (%) (<i>in natura</i>)	85,40 ± 0,01
Cinzas (%) (base seca)	9,28 ± 0,001
Proteína (%) (base seca)	16,24 ± 1,39
Carboidratos (%) (base seca)	66,23 ± 0,1
Lipídeos (%) (base seca)	6,23 ± 0,01

Nota: Valores expressos como média ± desvio padrão de 3 repetições.

Os resultados apresentados confirmam o potencial nutritivo das folhas de peixinho da horta, colhidas em Campo Grande – Horta Flor do Cerrado, comparando-se com outras pesquisas, o valor da umidade variou de 75 a 78,22% respectivamente (AZEVEDO, 2018; BOTREL et al., 2020).

Em relação aos valores de cinzas, proteínas, lipídios e carboidratos, estão próximos aos encontrados por Azevedo (2018): cinzas 6,88%, proteínas 19,22%, lipídios 3,04%, carboidratos 58,9%.

Quando se compara os resultados do peixinho com os de outros vegetais folhosos da alimentação é possível visualizar seu potencial nutritivo: a couve manteiga por exemplo apresenta 2,9% de proteínas e 1,3% de cinzas, a rúcula amplamente consumida, 1,8% de proteínas e 1,1% de cinzas; nesse estudo, o

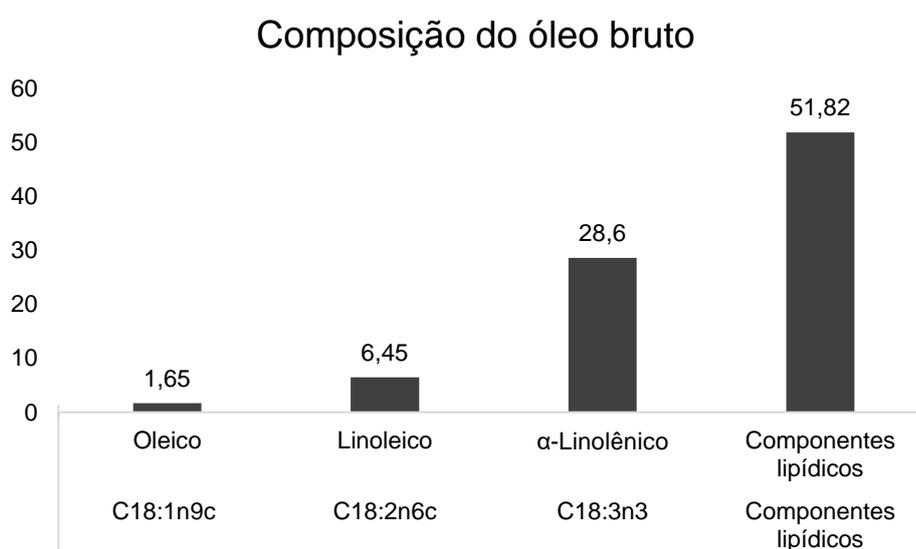
peixinho apresentou 16,24% de proteína e 9,2% de cinzas (TBCA, 2020), sendo uma das PANC com alto índice proteico e mineral, assim como as PANC Ora pro nobis, que apresenta 27,79% de proteína (GONÇALVES, 2014) e a Moringa com 18,31% de proteína (MACAIMBRA,2018).

5.2 Composição do óleo bruto de *Stachys byzantina*

Em relação ao rendimento o óleo bruto das folhas de *Stachys byzantina* apresentou um valor de 1,7%, cálculo realizado em relação às folhas *in natura*, como descrito na metodologia.

Após a extração do óleo bruto os resultados obtidos demonstraram que aproximadamente metade do óleo é composto por ácidos graxos, com um percentual de 48%. A figura 11 representa os percentuais dos principais ácidos graxos encontrados no óleo bruto da *Stachys byzantina*; observou-se ainda que 51,82% são outros compostos. Na Figura 11 está presente a composição do óleo bruto.

Figura 11 - Porcentagem (%) dos principais ácidos graxos encontrados no óleo bruto de *Stachys byzantina*.



5.3 Perfil de ácidos graxos do óleo bruto de *Stachys byzantina* determinado pela CG-FID

A composição dos AGs do óleo bruto das folhas de *Stachys byzantina* determinada pelo cromatógrafo a gás está representada na Tabela 2.

Tabela 2 – Perfil de ácidos graxos das folhas de peixinho-da-horta (*Stachys byzantina*).

Ácidos graxos	Porcentagem em AG (%)	Porcentagem em óleo bruto(%)
Láurico (C12:0)	0,43	0,21
Tridecílico (C13:0)	2,46	1,19
Mirístico (C14:0)	0,81	0,39
Pentadecílico (C15:0)	0,74	0,36
Palmítico (C16:0)	12,25	5,91
Palmitoleico (C16:1)	0,46	0,22
Margárico (C17:0)	0,64	0,31
Esteárico (C18:0)	2,15	1,04
Oleico (C18:1n9c)	3,43	1,65
Linoleico (C18:2n6c)	13,38	6,45
α -Linolênico (C18:3n3)	59,31	28,60
Araquidônico (C20:0)	0,77	0,38
Dihomo-gamma-linolênico (C20:3n3)	0,83	0,40
Erúcico (C22:1n9)	0,50	0,24
Eicosapentaenoico (C20:5n3)	0,44	0,21
Tricosílico (C23:0)	0,44	0,22
Nervônico (C24:1n9)	0,89	0,43
Σ AGS	20,73	10,00
Σ AGMI	4,40	2,55
Σ AGPI	73,97	35,66
Σ AGI	78,36	38,46
Total de ácidos graxos identificados	100	48,21

Tabela 2: Σ AGS: somatório de ácidos graxos saturados; Σ AGMI: somatório de ácidos graxos monoinsaturados; Σ AGPI: somatório de ácidos graxos poli-insaturados e Σ AGI: somatório de ácidos graxos insaturados.

Os valores apresentados na tabela demonstram que as folhas de *Stachys byzantina* apresentam teores consideráveis de ácido palmítico (12,25%), ácido Linoleico (13,38%) e α -linolênico (59,31%).

Os resultados merecem destaque uma vez que os ácidos linoleico e alfa-linolênico são AG essenciais, ou seja, precisam ser adquiridos através da alimentação. Segundo DERMITAS et al. (2013), que pesquisou o perfil de AG, na Turquia, os principais ácidos graxos encontrados foram ácido linoléico (27,15%) e α -linolênico (19,66%). Essas diferenciações passam por influência de diversos fatores como: diferentes localidades geográficas, estações, períodos de colheita, propriedades dos solos e condições climáticas afetam fortemente a composição do metabólito secundário das espécies de plantas (THOMA et al., 2020).

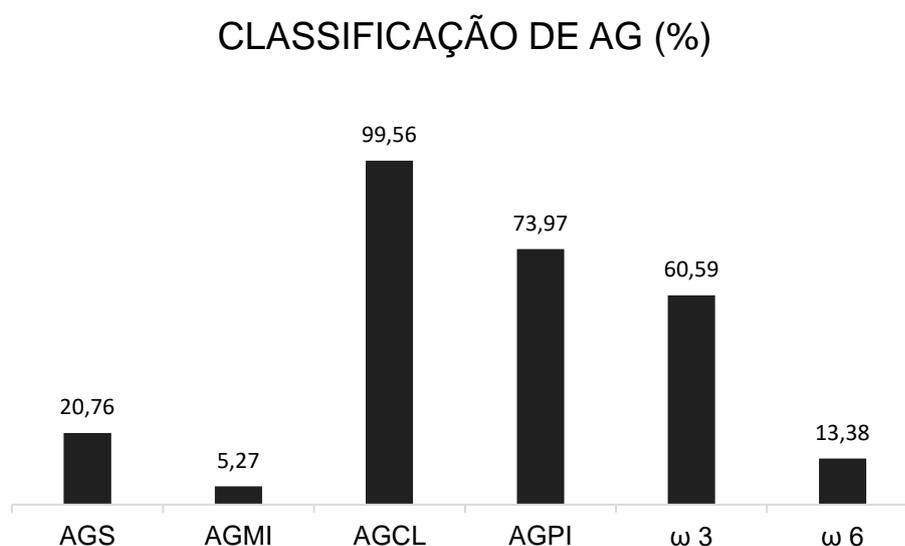
O ácido alfa linolênico é o majoritário com 59,31% na composição de ácidos graxos, dado muito relevante visto que se trata de um AG essencial. Em comparação com outros óleos brutos é um teor elevado. O óleo de girassol por exemplo apresentou 6,29% do mesmo componente, a amêndoa de pequi 0,29%, em folhas de guariroba 3,04% (VICENTINI-POLETTE et al. 2021; DAMIANI et al. 2013; BUZIN et al. 2016).

Em seguida os maiores teores são do ácido linolênico (13,38%), que também é um AG essencial, e ácido palmítico (12,25%). Em estudo sobre perfil de ácidos graxos o óleo de girassol apresentou teores mais elevados de ácido linolênico 49,94% e o folhas de guariroba mais baixos, 8,71% de ácido linolênico e 9,35% de ácido palmítico (VICENTINI-POLETTE et al 2021; DAMIANI et al 2013; BUZIN et al 2016).

O perfil de ácidos graxos de vegetais e de variadas partes das plantas vêm sendo analisados em pesquisas científicas. Sobre plantas amazônicas, foram analisadas a fração lipídica de 12 espécies: gordura de muru muru; gordura de ucuúba; gordura de cupuaçu; gordura de bacuri; óleo de buriti; óleo de castanha do Pará; óleo de patawa; óleo de semente de paixão; óleo de pracaxi; óleo de copaíba; óleo de andiroba e óleo de babaçu. O teor de ácido alfa-linolênico foi 0 a 0,97% em onze amostras, sendo que a gordura de cupuaçu apresentou um valor de 11,37%. Entretanto o ácido linoleico trouxe valores maiores sendo a amostra de óleo de sementes de paixão o valor mais elevado deste AG com 69,22%. O componente que apresentou maiores teores em comum foi o ácido oleico chegando a 78,55% na amostra de óleo de buriti (SERRA et.al, 2019).

A comparação destes resultados demonstra que os teores encontrados no óleo bruto das folhas de *Stachys byzantina* são diferentes de outras amostras analisadas, sendo os teores de AG essenciais maiores no peixinho do que nas espécies estudadas por Serra (2019).

Figura 12 - Porcentagem (%) das classificações de AG. AGS: ácidos graxos saturados, AGMI: ácidos graxos monoinsaturados, AGCL: ácidos graxos de cadeia longa, AGPI: ácidos graxos poli-insaturados, ω -3: família ômega3, ω -6: família ômega 6.



Através da observação da figura 12 é possível afirmar que os AGCL predominam na composição do óleo bruto das folhas de *Stachys byzantina* com 99,56%, outro dado notável é o percentual de AGPI com 73,97%. Dados também importantes são relativos às famílias ω -3 e ω -6, pode-se observar que 60,59% dos AG presentes na amostra são de ω -3.

Apesar das hortaliças apresentarem baixo teor lipídico o consumo de vegetais como o agrião, a couve, a alface, o espinafre e o brócolis, contribui para elevar a sua ingestão de AG essenciais, especialmente em dietas vegetarianas. Entre os ácidos graxos da família ômega 3 os mais pesquisados são o EPA (ácido eicosapentaenóico) e o DHA (ácido docosahexaenóico) encontrados especialmente nos óleos de peixes, estes compostos são capazes de ajudar no controle da dislipidemia e conter reações inflamatórias, entre outros benefícios. Dessa forma, podem ser coadjuvantes no tratamento de doenças cardiovasculares (ELAGIZI et al., 2021).

Vegetais de folhas verdes são alimentos ricos em ω -3, dessa forma utilizar as folhas de peixinho podem contribuir como agente terapêutico em doenças com um componente inflamatório, alterando a composição de ácidos graxos das células envolvidas na resposta inflamatória e afetando também a produção de mediadores de inflamação (DJURICIC; CALDER, 2021).

Os percentuais de AG saturados, monoinsaturados e poli-insaturados são dados importantes a serem analisados, visto que a presença de AG poli-insaturados é benéfica para a saúde. Na amostra de *Stachys byzantina* o percentual de AGPI foi de 73,97%, em estudo realizado com plantas amazônicas o maior valor para AGPI foi apresentado no de óleo de sementes de paixão com 69,39% e o menor foi o de gordura de ucuúba com 0,5%, resultados que revelam um potencial positivo para o peixinho da horta (ELAGIZI et al., 2021; SERRA et al., 2019).

5.4 Análise do óleo bruto quanto às suas características

Os parâmetros de caracterização físico-química utilizados para qualificar o óleo bruto das folhas de *Stachys byzantina* estão sumarizados na Tabela 3.

Tabela 3 - Caracterização do óleo bruto das folhas de *Stachys byzantina*

Parâmetros	Valores
Índice de iodo ($\text{gl}_2100 \text{ g}^{-1}$)	190,36
Índice de acidez (mg KOHg^{-1})	13,08
Índice de peróxido ($\text{meq. O}_2\text{kg}^{-1} \text{ oil}$)	1097,45

O índice de iodo mensura a insaturação que classifica óleos, gorduras e é utilizado como controle de alguns processamentos. Esse índice fundamenta-se no fato de que iodo e outros halogênios se adicionam numa dupla ligação da cadeia insaturada dos ácidos graxos (ARAÚJO, 1999; MORETTO; ALVES, 1998).

O índice de acidez indica a rancidez hidrolítica que é a hidrólise da ligação éster por lipase e umidade, define-se como o número de miligramas (mg) de hidróxido de potássio necessário para neutralizar os ácidos livres de um grama (g) da amostra. Este indicador mostra o estado de conservação dos óleos, a

decomposição dos glicerídeos é acelerada por aquecimento e pela luz, e a rancidez é quase sempre acompanhada pela formação de ácido graxo livre (ARAÚJO, 1999; MORETTO; ALVES, 1998).

O índice de peróxido indica a rancidez oxidativa que é a auto oxidação dos acilgliceróis com ácidos graxos insaturados por oxigênio atmosférico. Aponta o grau de oxidação do óleo e sua presença é o indicativo de que a deterioração do sabor e odor, em função de sua estabilidade, está iniciando. Sua concentração atingindo um determinado nível, ocorrem mudanças complexas, que formam compostos de baixo peso moleculares oriundos de sua degradação (ARAÚJO, 1999; MORETTO; ALVES, 1998).

Os índices encontrados revelam um índice de iodo ($190,36 \text{ gl}_2100 \text{ g}^{-1}$) elevado. Em estudos realizados com amostras de babaçu ($17,30 \text{ gl}_2100 \text{ g}^{-1}$), buriti ($138,49 \text{ gl}_2100 \text{ g}^{-1}$), macaúba ($56,70 \text{ gl}_2100 \text{ g}^{-1}$) e pinhão manso ($94,50 \text{ gl}_2100 \text{ g}^{-1}$), essa comparação entre os resultados mostra que o valor está superior as amostras analisadas por De Moura et al., 2019.

No parâmetro de acidez o óleo bruto de peixinho da horta também apresentou um valor elevado ($13,08 \text{ mg KOHg}^{-1}$), para comparar com outras amostras os óleos de babaçu ($1,58 \text{ mg KOHg}^{-1}$), buriti ($1,67 \text{ mg KOHg}^{-1}$), macaúba ($8,74 \text{ mg KOHg}^{-1}$) e pinhão manso ($3,99 \text{ mg KOHg}^{-1}$). O parâmetro índice de peróxido foi avaliado e acompanhando os demais apresentou um teor elevado ($1097,45 \text{ meq. O}_2\text{kg}^{-1} \text{ oil}$), na comparação com outras amostras a diferença é maior dos parâmetros avaliados óleos de babaçu ($1,52 \text{ meq. O}_2\text{kg}^{-1} \text{ oil}$), buriti ($6,20 \text{ meq. O}_2\text{kg}^{-1} \text{ oil}$), macaúba ($16,83 \text{ meq. O}_2\text{kg}^{-1} \text{ oil}$) e pinhão manso ($2,77 \text{ meq. O}_2\text{kg}^{-1} \text{ oil}$) (DE MOURA et al., 2019).

Os óleos tem sido objetos de estudo de inúmeras pesquisas, de diferentes partes de plantas. Um desses estudos avaliou frutos amazônicos: gordura de muru muru; gordura de ucuúba; gordura de cupuaçu; gordura de bacuri; óleo de buriti; óleo de castanha do pará; óleo de patawa; óleo de semente de paixão; óleo de pracaxi; óleo de copaíba; óleo de andiroba e óleo de babaçú. Em relação aos índices de qualidade o óleo da *Stachys byzantina*, a acidez foi maior em relação as espécies de muru muru, cupuaçu, buriti, pracaxi, patawa, babaçu, semente de paixão e castanha do pará, entretanto o índice de acidez foi menor em relação as amostras de ucuúba, bacuri, copaíba e andiroba. O valor de acidez mais próximo foi do bacuri com $16,78 \text{ mg KOHg}^{-1}$, sendo o do peixinho $13,08 \text{ mg KOHg}^{-1}$ (SERRA et al., 2019).

Quando se comparam os índices de iodo e peróxido no mesmo artigo, há grande variação entre as amostras, os valores mais próximos do peixinho (190,36 $\text{gl}_2100 \text{ g}^{-1}$) foram: óleo de copaíba (187,96 $\text{gl}_2100 \text{ g}^{-1}$), óleo de semente de paixão (125,87 $\text{gl}_2100 \text{ g}^{-1}$), os menores valores foram de gordura de muru muru (11,15 $\text{gl}_2100 \text{ g}^{-1}$) e óleo de babaçu (10,36 $\text{gl}_2100 \text{ g}^{-1}$), sendo que índice de iodo das folhas de peixinho da horta apresentou valor superior ao de todas as amostras. O índice de peróxido foi o parâmetro com maior disparidade o resultado do peixinho foi de 1097,45 meq. O_2kg^{-1} oil, enquanto nas amostras o estudo em questão o maior valor foi do óleo de castanha do Pará (63,18 meq. O_2kg^{-1} oil) e o menor do óleo de copaíba (0,12 meq. O_2kg^{-1} oil) (SERRA, et al., 2019).

5.5 Análise espectrométrica: UV-Vis

Foram observadas bandas de absorção entre 200 e 700 nm na amostra de extrato do óleo bruto de peixinho da horta, sendo evidenciadas bandas de absorção distintas para as diferentes concentrações. Os espectros indicam a presença de antioxidantes naturais das famílias dos tocoferóis (~255nm) e carotenoides (~445nm e 475nm). Além disso foi observada também a presença de bandas características da absorção da clorofila a (410nm, 610nm e 670nm) (SMYK, 2021; USTIN et al., 2009; BORELLO; RONCUCCI; DOMENICI, 2021).

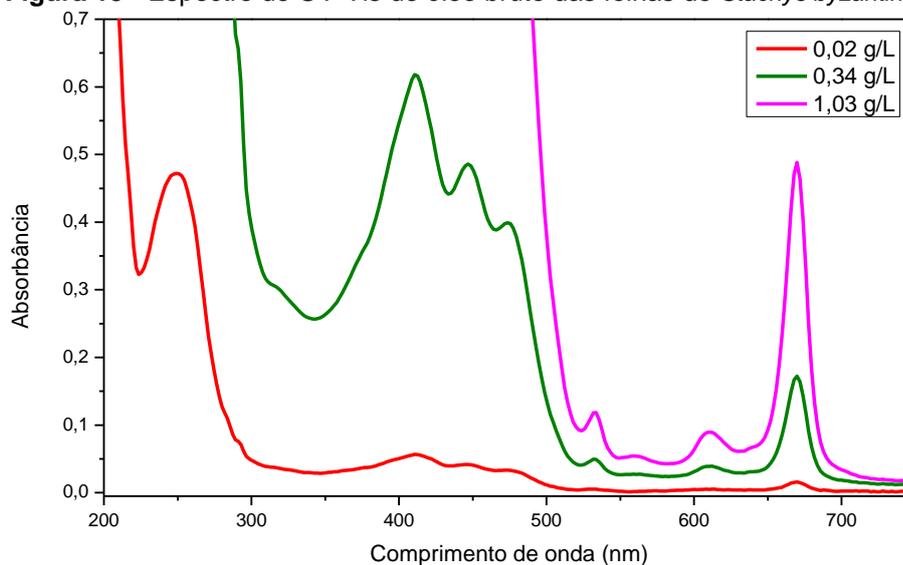
Tocoferóis são compostos monofenólicos, existentes em vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas, que possuem atividade antioxidante e de vitamina E. (REFOSCO et al., 2019)

Os carotenoides constituem um grupo de polienos que desempenham papel fundamental na saúde humana e atuam como alimentos funcionais e nutracêuticos. São capazes de retardar o estresse oxidativo celular e, conseqüentemente, auxiliar na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis, como obesidade, câncer, diabetes e enfermidades cardiovasculares. Carotenoides como o β -caroteno são precursores da vitamina A, que como todos os nutrientes essenciais, precisa ser fornecida ao organismo (SILVA et al., 2013).

Os resultados encontrados estão apresentados na Figura 13 demonstram a presença de componentes importantes no óleo bruto, como tocoferóis e carotenoides, bem como a clorofila. Este pigmento é responsável pela cor verde dos óleos vegetais como no azeite de oliva que apresenta uma cor verde com tons

dourados, é lipossolúvel. Na maioria dos óleos, a clorofila é retirada durante o processo de refino. Justifica-se esse processo visto que a presença de clorofila em óleos vegetais favorece reações oxidativas que tendem a comprometer a qualidade do óleo (LI et al., 2019)

Figura 13 - Espectro de UV-Vis de óleo bruto das folhas de *Stachys byzantina*.



5.6 Avaliação da atividade anticâncer *in vitro* do óleo da *Stachys byzantina*

Na Tabela 4 são apresentados os resultados dos testes da ação anticâncer em cinco linhagens neoplásicas: B16F10 (melanoma), MCF7 (mama), 786-0 (rim), U251 (glioma) e NIH/3T3 (células normais). Sendo cinco extratos: óleo bruto, B1 = extrato etanólico, B2 = extrato diclorometano, B3 = extrato hidroetanólico e B4 = extrato hidroacetônico.

Tabela 4 : Valores de inibição de crescimento (GI50)* do óleo bruto de *Stachys byzantina* e seus extratos em linhagens B16-F10 (melanoma murino), 786-0 (carcinoma de rim), MCF7 (carcinoma de mama), U251 (glioma) e NIH/3T3 (células normais)

AMOSTRAS	LINHAGENS				
	B16F10 (melanoma) GI50 µg/mL	MCF7 (mama) GI50 µg/mL	786-0 (rim) GI50 µg/mL	U251 (glioma) GI50 µg/mL	NIH/3T3 GI50 µg/mL
Óleo bruto	78,08	59,08	278,37	38,29	> 250
Doxorrubicina	0,25	0,2	0,02	0,2	0,32

*Concentração que inibe 50% do crescimento celular foi determinada por análise de regressão não-linear utilizando Programa *ORIGIN* 6,0. Resultados em µg/mL

Tabela 5 : Valores de inibição de crescimento (GI50)* dos extratos de *Stachys byzantina* em linhagens B16-F10 (melanoma murino), HUVEC (células humanas de cordão umbilical), PC -3 (adenocarcinoma de próstata) e NIH/3T3 (células normais)

AMOSTRAS	LINHAGENS			
	B16F10 (melanoma) GI50 µg/ml	HUVEC (células humanas de cordão umbilical) GI50 µg/ml	PC -3 (adenocarcinoma de próstata)	NIH/3T3 (fibroblastos murino) GI50 µg/ml
B1 (Extrato etanólico)	NT*	> 250	> 250	> 250
B2 (Extrato diclorometano)	>250	> 250	> 250	> 250
B3 (Extrato hidroetanólico)	31,61	> 250	> 250	> 250
B4 (Extrato hidroacetônico)	25,66	> 250	> 250	> 250
Doxorrubicina	0,25	0,2	0,02	0,32

*NT = não testado

E. Háznagy-Radnai et al. (2013), avaliou a atividade citocida de espécies de *Stachys*, dentre elas a *byzantina*. O extrato hidrometanólico das folhas foi testado na linhagem MCF-7 (adenocarcinoma de mama), na concentração de 10 µg/mL, causando uma inibição de 39,85 % no crescimento celular. No presente estudo o óleo bruto foi testado e causou uma inibição de 50% no crescimento celular na concentração de 59,08 µg/mL (Tabela 4). Segundo Jassbi et al. (2014) o extrato diclorometano da *S. byzantina* apresentou IC50 de 131.0 µg/mL, na mesma linhagem, valor superior ao encontrado no óleo bruto em MCF7.

Em relação à atividade citotóxica na linhagem 3T3 (fibroblasto murino), Khanavi et al.(2012), avaliaram extrato hidrometanólico das folhas em 4 espécies de *Stachys* (*S. laxa* , *S. turcomanica* , *S. subaphylla* e *S. trinervis*) e obtiveram uma GI50 superior a 308.7 µg/mL, corroborando os resultados encontrados no estudo. No presente estudo acima de 25µg, não apresentou toxicidade, corroborando Azevedo, 2018, que avaliou a toxicidade em *Artemia salina*, o LC₅₀ registrado foi maior que 1000 ppm para o ensaio, o que sugeriu ausência de toxicidade.

Erdogan et al., 2013 investigaram a viabilidade celular do óleo essencial da *Stachys rupestres* nas linhagens PC-3 (próstata) e MCF7(adenocarcinoma de mama) com IC50 de 57.9 e 41.3 µg/mL, respectivamente. Ressalta-se que a GI50 do óleo bruto em MCF7 foi de 59,0822 µg/mL.

5.7 Atividade antimicrobiana

Foram testados os extratos: hidroacetônico, hidroetanólico e etanólico, por conta da contaminação bacteriológica não foi possível testar os demais extratos. Em relação atividade antimicrobiana os extratos testados, não apresentaram ação antimicrobiana.

As observações foram realizadas com 24h e 48h, sendo que para a cepa *Candida albicans* foi realizada a observação em três períodos: de 48h, 36h e 72h. Para a comparação, cada extrato contava com uma placa de discos brancos para cada antibiótico. Os antibióticos utilizados estão descritos na metodologia, sendo que nenhum dos extratos apresentou halos de inibição ou atividade inibitória.

Apesar dos extratos testados nesse estudo não terem apresentado atividade inibitória outros estudos com a *Stachys byzantina* apresentaram halos de inibição em relação há alguns microrganismos. Em estudo que investigou quatro espécies de *Stachys*, entre elas a *byzantina*, os resultados concluíram que a extratos metanólicos dessas plantas têm um potencial como fonte de agente antibacteriano de origem natural, os microrganismos avaliados foram: *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sanguis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, *Aspergillus niger* e *Candida albicans*, a *Stachys byzantina* apresentou maior atividade frente ao *Streptococcus sanguis*, com um halo de 8,7 na concentração de 50ug (SAEEDI et al., 2008)

Outro resultado considerável avaliou 35 espécies vegetais e sua ação anticandida, dessas 13 apresentaram atividade inibitória, entre elas a *Stachys byzantina*, os resultados indicaram que os óleos essenciais de três plantas: *Achillea millefolium*, *Mikania glomerata* e *Stachys byzantina* exerceram uma forte atividade, em níveis de 0,25 mgmL⁻¹, e será ainda caracterizado. Em estudo realizado no Brasil, a atividade inibitória mínima do extrato foi maior contra as bactérias *Staphylococcus aureus*, seguida por *Bacillus cereus* e *Klebsiella pneumoniae*, sendo que o extrato seco foi diluído em água destilada estéril nas seguintes concentrações

seriadas: 80 mg/mL, 40 mg/mL, 20 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL, 2,5mg/mL, 1,25 mg/mL e 0,625 mg/mL (DUARTE et al., 2005; AZEVEDO, 2018).

6. CONCLUSÃO

As folhas de peixinho-da-horta apresentam elevado teor proteico e de cinzas, mostrando-se um alimento nutritivo e com alto teor de minerais. A inserção do peixinho na alimentação se mostra promissora, pois além de possuir ácidos graxos essenciais em sua composição, tem um valor proteico elevado, bem como o teor de cinzas.

O perfil de ácidos graxos se mostrou promissor, apesar de o teor de lipídios ser baixo por se tratar de um vegetal, comparando-se com folhas similares seu teor é considerável e os ácidos graxos majoritários são AG essenciais, além disso sua composição é predominantemente de poli-insaturados que contribuem positivamente para a saúde, auxiliando na prevenção de doenças. Sugere-se consumir peixinho-da-horta, na sua forma processada de farinha, adicionado em produtos de panificação por exemplo.

A análise UV-Vis permitiu verificar compostos importantes no óleo bruto como tocoferóis, carotenoides e clorofila. A atividade antimicrobiana não apresentou halos de inibição nas concentrações e cepas testadas. Recomenda-se novos testes visto que a literatura relata atividade inibitória para a *Stachys byzantina*.

O óleo bruto e os extratos não apresentaram efeito citotóxico na linhagem de fibroblasto murino, com GI50 maior q 250µg/mL nem nas células de HUVEC, resultado promissor em relação a toxicidade, porém recomenda-se avaliar a toxicidade aguda posteriormente. Os resultados para as células de glioma foram benéficos, valores de GI50 = 38,29 para o extrato do óleo bruto.

REFERÊNCIAS

- ANVISA, **Metodologia dos Testes de Sensibilidade a Agentes Antimicrobianos por Diluição para Bactéria de Crescimento Aeróbico**: Norma Aprovada. 6.ed. Brasília: 2003.
- ARAÚJO, J. M. A; **Química de alimentos – Teoria e Prática**. 2a edição. Editora da Universidade Federal de Viçosa (UFV), Viçosa, 1999.
- AZEVEDO, T. D. de. **Propriedades nutricionais, antioxidantes e toxicidade preliminar do peixinho da horta (*Stachys byzantina* K. Koch)**. [recurso eletrônico] – Curitiba, 2018. Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Alimentação e Nutrição. Setor da Saúde. Universidade Federal do Paraná, 2018. Disponível em: <https://hdl.handle.net/1884/58899>. Acesso em: 15 jan. 2020.
- BADKE, M. R.; BUDÓ, M. D. L. D; ALVIM, N. A. T; ZANETTI, G. D; HEISLER, E. V. Saberes e práticas populares de cuidado em saúde com o uso de plantas medicinais. **Texto e Contexto-Enfermagem**, v. 21, n. 2, p. 363-370, 2012.
- BARRY A.L.; THORNSBERRY C.; 1991. Susceptibility tests: Diffusion Test Procedures. In: Balows A, Hauser WJ, Hermann KL, Isenberg HD, Shamody HJ. **Manual of clinical microbiology**. 5.ed. Washington, DC: American Society for Microbiology, p.1117-1125. 1991.
- BENJAMIM, Cicero Jonas Rodrigues et al. O consumo de ômega 3 e 6 e a sua relação com doenças crônicas não transmissíveis. **Revista E-Ciência**, v. 6, n. 2, 2019.
- BITTENCOURT-JUNIOR et al. Estudo da atividade antimicrobiana do extrato hidroalcoólico da *Ilex paraguayensis*. **Interbio**. v.6, n.2, p.48-54, 2012. Disponível em <http://webcache.googleusercontent.com/search?q=cache:HRR3irhJeSgJ:www.unigran.br/interbio/paginas/ed_anteriores/vol6_num2/arquivos/artigo5.pdf+&cd=1&hl=pt-BR&ct=clnk&gl=br> Acesso em 18 mar. 2021.
- BOATENG, L.; ANSONG, R.; OWUSU, W. B.; STEINER-ASIEDU, M. Coconut oil and palm oil's role in nutrition, health and national development: A review. **Ghana Medical Journal**, v. 50, n. 3, p. 189-196, 2016.
- BORELLO, Eleonora; RONCUCCI, Daniele; DOMENICI, Valentina. Study of the Evolution of Pigments from Freshly Pressed to 'On-the-Shelf' Extra-Virgin Olive Oils by Means of Near-UV Visible Spectroscopy. **Foods**, v. 10, n. 8, p. 1891, 2021.
- BOTREL, Neide et al. Valor nutricional de hortaliças folhosas não convencionais cultivadas no Bioma Cerrado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 23, 2020.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de hortaliças não-convencionais / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. Brasília. Mapa/ACS, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. Departamento de atenção Básica. **Guia alimentar para a população brasileira** / ministério da saúde, secretaria de atenção à saúde, departamento de atenção Básica. 2. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRIGGS, M. A.; PETERSEN, K. S.; KRIS-ETHERTON, P. M. Saturated fatty acids and cardiovascular disease: Replacements for saturated fat to reduce cardiovascular risk. **Healthcare**, v. 5, n. 2, p. E29, 2017. doi: 10.3390/healthcare5020029.

BUZIN, Estevão et al. Perfil de ácidos graxos de folhas e amêndoas orgânicas de Guariroba. **Enciclopédia Biosfera**, v. 13, n. 23, 2016.

CASTRO; Cristina Maria; DEVIDE, Antônio Carlos Pries. **Cultivo e Propriedades de Plantas Alimentícias não Convencionais PANC**. 2016.

Disponível em: <<http://www.aptaregional.sp.gov.br/documentos-diversos/1706-cartilha-cultivo-e-propriedades-d-plantas-alimenticias-nao-convencionais-panc/file.html>>.

Acesso em: 13 jun. 2022.

CERVATO-MANCUSO, A. M.; GOMES, F. E.; SILVA, R. S. C. Da. **Guia de segurança alimentar e nutricional**. Barueri: Editora Manole, 2015.

COUNCIL OF EUROPE 2010. European Pharmacopoeia, 7th ed., **European Directorate for the Quality of Medicines**: Strasbourg, France, p. 241.

CLSI - Clinical Laboratory Standards Institute. Padronização dos Testes de Sensibilidade a Antimicrobianos por Disco-difusão: Norma Aprovada - 8ª ed. M2-A8. v.23, n.1, 2005.

CUNNIFF, Patricia. Official methods of analysis. **Association of Official Analytical Chemists (AOAC)**. 16 ed. Arlington, Virginia, USA, 1995.

DA CRUZ MONTEIRO, S.; BRANDELLI, C. L. C. **Farmacobotânica: Aspectos Teóricos e Aplicação**. Porto Alegre: Artmed Editora, 2017.

DAMIANI, Clarissa et al. Perfil de ácidos graxos e fatores antinutricionais de amêndoas de pequi crua e torrada. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v. 43, p. 71-78, 2013.

DAMODARAN, Srinivasan; PARKIN, Kirk L. **Química de alimentos de Fennema**. Artmed editora, 2019.

DAS, U. N. Essential fatty acids: biochemistry, physiology and pathology. **Biotechnology Journal**, Weinheim, v. 1, n. 4, p. 420-439, 2006.

DA SILVA, Camila Pacheco et al. os Benefícios dos Ácidos Graxos Ômega 3 na Alimentação: uma Breve Revisão. **International Journal of Nutrology**, v. 11, n. S 01, p. Trab600, 2018.

DEMIRTAS, I.; GECIBESLER, I. H.; YAGLIOGLU, A. S. Antiproliferative activities of isolated flavone glycosides and fatty acids from *Stachys byzantina*. **Phytochemistry Letters**, v. 6, n. 2, p. 209-214, 2013.

DE MOURA, C. V. R. et al. Caracterização físico-química de óleos vegetais de oleaginosas adaptáveis ao Nordeste Brasileiro com potenciais para produção de biodiesel. **Embrapa Meio-Norte-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2019.

DUARTE, Marta Cristina Teixeira et al. Anti-Candida activity of Brazilian medicinal plants. **Journal of ethnopharmacology**, v. 97, n. 2, p. 305-311, 2005.

DJURICIC, I.; CALDER, P. C. Beneficial outcomes of omega-6 and omega-3 polyunsaturated fatty acids on human health: an update for 2021. **Nutrients**, v. 13, n. 7, p. 2421, 2021.

ERDOGAN, Elif Ayşe et al. Chemical composition and *in vitro* cytotoxic activity of the essential oils of *Stachys rupestris* and *Salvia heldreichiana*, two endemic plants of Turkey. **Natural Product Communications**, v. 8, n. 11, p. 1934578X1300801134, 2013.

ELAGIZI, Andrew et al. An update on omega-3 polyunsaturated fatty acids and cardiovascular health. **Nutrients**, v. 13, n. 1, p. 204, 2021.

ELST, V. K.; BRUINING, H.; BIRTOLI, B.; TERREAUX, C.; BUITELAAR, J. K.; KAS, M. J. Food for thought: Dietary changes in essential fatty acid ratios and the increase in autism spectrum disorders. **Neuroscience and Biobehavioral Reviews**, v. 45, n. 1, p. 369-378, 2014. doi: 10.1016/j.neubiorev.2014.07.004.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. **Métodos de preparação e análise de extratos vegetais**. 5 ed. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária; v.1, p.523, 2010

FONSECA, C.; LOVATTO, P.; SCHIEDECK, G.; HELLWIG, L.; GUEDES, A. F. A importância das Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) para a sustentabilidade dos sistemas de produção de base ecológica. **Cadernos de Agroecologia**, v. 13, n. 1, p. 07-13, 2018.

FLYNN, Katherine et al. An introduction to current food safety needs. **Trends in Food Science & Technology**, v. 84, p. 1-3, 2019.

FRESHNEY, Norman W. et al. Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. **Cell**, v. 78, n. 6, p. 1039-1049, 1994.

GONÇALVES, JPZ et al. Quantificação de proteínas e análise de cinzas encontradas nas folhas e caule da ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller). In: **CONGRESSO BRASILEIRO DE ENGENHARIA QUÍMICA. 2014**.

HAJIMEHDIPOOR, H.; GOHARI, A. R.; AJANI, Y.; SAEIDNIA, S. Comparative study of the total phenol content and antioxidant activity of some medicinal herbal extracts. **Research Journal of Pharmacognosy (RJP)**, v. 1, n. 3, p. 21-25, 2014.

IAL-INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.

JAIN, Chitra; KHATANA, Shivani; VIJAYVERGIA, Rekha. Bioactivity of secondary metabolites of various plants: a review. **Int. J. Pharm. Sci. Res**, v. 10, n. 2, p. 494-504, 2019.

JASSBI, Amir Reza et al. Cytotoxic, antioxidant and antimicrobial effects of nine species of woundwort (*Stachys*) plants. **Pharmaceutical Biology**, v. 52, n. 1, p. 62-67, 2014.

KEAWPRADUB, Niwat et al. Antiplasmodial activity of extracts and alkaloids of three *Alstonia* species from Thailand. **Planta medica**, v. 65, n. 08, p. 690-694, 1999.

KHANA VI, M.; HADJIAKHOONDI, A.; SHAFIEE, A.; MASOUDI, S.; RUSTAIYAN, A. Chemical composition of the essential oil of *Stachys byzanthina* K. Koch. from Iran. **Journal of Essential Oil Research**, v. 15, n. 2, p. 77-78, 2003.

KHANA VI, Mahnaz et al. Investigation of cytotoxic activity in four *Stachys* species from Iran. **Iranian journal of pharmaceutical research: IJPR**, v. 11, n. 2, p. 589, 2012.

KINUPP, V. F.; LORENZI, H. J. **Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) no Brasil: guia de identificação, aspectos nutricionais e receitas ilustradas**. 2014.

LI, Xue et al. Effect of chlorophyll on lipid oxidation of rapeseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 121, n. 4, p. 1800078, 2019.

LIMA, B.R.G.; COELHO, A.F.S. Investigação *in vitro* da atividade antimicrobiana do extrato do chá *Ayahuasca*. **Higiene Alimentar**. v.27, n.220/221, p.121-126, 2013.

MACAMBIRA, G. M. et al. Caracterização nutricional das folhas de *Moringa oleifera* (MOL) para frangos de corte. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 70, p. 570-578, 2018.

MAIA, Everaldo Lima; RODRIGUEZ-AMAYA, Délia B. Avaliação de um método simples e econômico para a metilação de ácidos graxos com lipídios de diversas espécies de peixes. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 53, n. 1-2, p. 27-35, 1993.

MARQUES, Lucilene Alves; DA COSTA, Murilo Lopes. Relevância da prescrição farmacêutica de nutracêuticos: Uma revisão de literatura. 2022.

MORETTO, E; ALVES, R. F; **Tecnologia de óleos e gorduras vegetais na indústria de alimentos**. 1a edição. Livraria Varela, São Paulo, 1998.

ORSAVOVA, J.; MISUCOVA, L.; AMBROZOVA, J. V.; VICHA, R.; MLCEK, J. Fatty acids composition of vegetable oils and its contribution to dietary energy intake and dependence of cardiovascular mortality on dietary intake of fatty acids. **International**

Journal of Molecular Sciences, v. 16, n. 6, p. 12871-12890, 2015. doi: 10.3390/ijms160612871.

PEREIRA, M. G. **Caracterização do óleo de sementes de maracujá doce (*Passiflora alata* Curtis) e de maracujá azedo (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) obtido por diferentes métodos de extração**. 2017. 118 f. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos) Universidade Federal do Paraná, Curitiba.

RANIERI, G. R. (Org.). **Guia prático sobre PANCs: plantas alimentícias não convencionais**. São Paulo: Instituto Kairós, 2017.

REFOSCO, Eduarda Kaczuk et al. COMPOSTOS FENÓLICOS NA ALIMENTAÇÃO E SEUS BENEFÍCIOS PARA A SAÚDE: UMA REVISÃO DE LITERATURA. **Ciência Atual–Revista Científica Multidisciplinar do Centro Universitário São José**, v. 13, n. 1, 2019.

SAEEDI, M.; MORTEZA-SEMNANI, K., MAHDAVI, M. R.; RAHIMI, F. Antimicrobial studies on extracts of four species of *Stachys*. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 70, n. 3, p. 403, 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.4103/0250-474X.43021>. Acesso em: 10 abr. 2020.

SAINI, R. K.; KEUM, Y. S. Omega-3 and omega-6 polyunsaturated fatty acids: Dietary sources, metabolism, and significance-A review. **Life Sciences**, v. 15, n. 203, p. 255-267, 2018. doi: 10.1016/j.lfs.2018.04.049.

SAINI, R. K.; SHETTY, N. P.; GIRIDHAR, P. GC-ID/MS analysis of fatty acids in Indian cultivares of *Moringa oleifera*: potential sources of PUFA. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 91, n. 6, p. 1029-1034, 2014. doi: 10.1007/s11746-014-2439-9.

SAINI, Ramesh Kumar et al. Omega– 3 Polyunsaturated Fatty Acids (PUFAs): Emerging Plant and Microbial Sources, Oxidative Stability, Bioavailability, and Health Benefits—A Review. **Antioxidants**, v. 10, n. 10, p. 1627, 2021.

SANTOS, J. R. M. P. dos; ALBERT, A. L. M.; LEANDRO, K. C. Importância de uma regulamentação específica com as definições e classificações dos produtos comercializados como suplementos alimentares, alimentos funcionais e nutracêuticos. **Revista de Direito Sanitário, [S. l.]**, v. 19, n. 3, p. 54-67, 2019. DOI: 10.11606/issn.2316-9044.v19i3p54-67. Disponível em: <https://www.revistas.usp.br/rdisan/article/view/158497>. Acesso em: 18 ago. 2020.

SANTOS, R.D.; GAGLIARDI, A. C. M.; XAVIER, H. T.; MAGNONI, C. D.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A. M. P.; FENELON, G. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arq. Bras. Cardiol.**, São Paulo, v. 100, n. 1, supl. 3, p. 1-40, jan. 2013.

Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0066-782X2013000900001&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 16 jun. 2020.

SEGALL-CORRÊA, A. M.; MARIN-LEON, L. A segurança alimentar no Brasil: proposição e usos da escala brasileira de medida da insegurança alimentar (EBIA)

de 2003 a 2009. **Segurança Alimentar e Nutricional**, Campinas, SP, v. 16, n. 2, p. 1–19, 2015. DOI: 10.20396/san.v16i2.8634782. Disponível em: <https://periodicos.sbu.unicamp.br/ojs/index.php/san/article/view/8634782>. Acesso em: 21 ago. 2020.

SERRA, Josilene Lima et al. Alternative sources of oils and fats from Amazonian plants: Fatty acids, methyl tocols, total carotenoids and chemical composition. **Food research international**, v. 116, p. 12-19, 2019.

SKEHAN, Philip et al. New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 82, n. 13, p. 1107-1112, 1990.

SILVA, L. F. L. E.; SOUZA, D. C.; RESENDE, L. V.; NASSUR, R. D. C. M.; SAMARTINI, C. Q.; GONÇALVES, W. M. Nutritional Evaluation of Non-Conventional Vegetables in Brazil. **An. Acad. Bras. Ciênc.**, Rio de Janeiro, v. 90 n. 2, p. 1775-1787, 2018. Disponível em: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0001-37652018000401775&lng=en&nrm=iso. Acesso em: 20 jan. 2020.

SILVA, J. J. M.; ROGEZ, H. Avaliação da estabilidade oxidativa do óleo bruto de açaí (*Euterpe oleracea*) na presença de compostos fenólicos puros ou de extratos vegetais amazônicos. **Química Nova**, v.36, p.400-406, 2013.

SILVEIRA, Santamaria N. **PANCs e o Peixinho da Horta**. Boletim Ambiental. 2017. Disponível em: <<http://www.boletimambiental.com.br/noticia/2017-12-06/pancs-e-o-peixinho-da-horta/>>. Acesso em: 18 jun. 2022.

SIMONETTI, Mariana Grisa; SIMONETTI, Kerli Tatiane Grisa; DE FARIÑA, Luciana Oliveira. Biodiversidade como sustentabilidade: possibilidade de mercados para plantas alimentícias não convencionais (PANC). **Brazilian Journal of Development**, v. 7, n. 4, p. 35330-35348, 2021.

SMYK, Bogdan. Spectroscopic Evidence for Photooxidation of Tocopherols in n-Hexane. **Molecules**, v. 26, n. 3, p. 571, 2021.

Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TBCA). Universidade de São Paulo (USP). **Food Research Center (FoRC)**. Versão 7.1. São Paulo, 2020. [Acesso em: 13 mai 2020]. Disponível em: <http://www.fcf.usp.br/tbca>.

THOMA, Felix et al. Effects of light on secondary metabolites in selected leafy greens: A review. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 497, 2020.

USTIN, Susan L. et al. Retrieval of foliar information about plant pigment systems from high resolution spectroscopy. **Remote Sensing of Environment**, v. 113, p. S67-S77, 2009.

VAN DAEL, Peter. Role of n-3 long-chain polyunsaturated fatty acids in human nutrition and health: review of recent studies and recommendations. **Nutrition Research and Practice**, v. 15, n. 2, p. 137-159, 2021.

VICENTINI-POLETTE, Carolina Medeiros et al. Determination of free fatty acids in crude vegetable oil samples obtained by high-pressure processes. **Food Chemistry: X**, v. 12, p. 100166, 2021.

WHO and FAO joint consultation: fats and oils in human nutrition. **Nutr Rev.** 1995 Jul;53(7):202-5. doi: 10.1111/j.1753-4887.1995.tb01552.x. PMID: 7494623.