

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS**

**TEOR DE MINERAIS, PERFIL OXIDATIVO E
TOXICIDADE DE *Nopalea cochenillifera* (L.)
SALM-DICK (CACTACEAE)**

TESE DE DOUTORADO

Raquel Medina Martins Necchi

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

Raquel Medina Martins Necchi

**TEOR DE MINERAIS, PERFIL OXIDATIVO E
TOXICIDADE DE *Nopalea cochenillifera* (L.)
SALM-DICK (CACTACEAE)**

Tese apresentada ao Curso de Doutorado do Programa de Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Concentração em Farmacognosia, Fitoquímica e Farmacologia de Produtos Naturais Bioativos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM), como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Ciências Farmacêuticas**

Orientadora: Melânia Palermo Manfron

**Santa Maria, RS, Brasil
2016**

**Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Departamento de Farmácia Industrial**

A comissão examinadora, abaixo assinada,
aprova a Tese de Doutorado

**TEOR DE MINERAIS, PERFIL OXIDATIVO E TOXICIDADE DE *Nopalea
cochenillifera* (L.) SALM-DICK (CACTACEAE)**

elaborada por
Raquel Medina Martins Necchi

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Doutora em Ciências Farmacêuticas

COMISSÃO EXAMINADORA:

Melânia Palermo Manfron, Dra.(Presidente/Orientadora)

Aline de Oliveira Fogaça, Dra. (UNIFRA)

Leandro Machado de Carvalho, Dr. (UFSM)

Ricardo Bizogne Souto, Dr. (URI)

Sérgio Luiz Dalmora, Dr (UFSM)

Santa Maria, 15 de agosto de 2016.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade, pelo ensino gratuito e de qualidade.

À professora Dra. Melânia Palermo Manfron agradeço a orientação, a confiança e o conhecimento científico transmitido. Obrigada pela amizade, apoio e compreensão.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas e do Departamento de Farmácia Industrial pela contribuição acadêmica.

Aos colegas do laboratório de Farmacognosida UFSM pelo convívio agradável e inesquecível.

Ao meu esposo Eduardo, aos meus pais e as minhas irmãs que contribuíram para que este objetivo fosse atingido.

Em especial, agradeço a minha filha Luiza, pelo carinho e paciência.

À Deus, por iluminar a minha caminhada.

RESUMO

Tese de Doutorado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
Universidade Federal de Santa Maria

TEOR DE MINERAIS, PERFIL OXIDATIVO E TOXICIDADE DE *Nopalea cochenillifera* (L.) SALM-DICK (CACTACEAE)

AUTOR: RAQUEL MEDINA MARTINS NECCHI
ORIENTADORA: MELÂNIA PALERMO MANFRON
Data e Local: Santa Maria, 15 de agosto de 2016

Nopalea cochenillifera (L.) Salm-Dyck ocorre do México ao Panamá e encontra-se aclimatada em diversos países. É uma planta arbustiva que atinge 3 a 4 m de altura, possui tronco cilíndrico e artigos denominados cladódios. Esta espécie é conhecida por denominações como palma-doce e palma miúda. É utilizada na alimentação humana e na medicina tradicional como anti-inflamatória, analgésica, hipoglicemiante, hipolipidemiante, antimicrobiana e diurética. Nos cladódios de *N. cochenillifera* estão presentes, flavonoides, saponinas, taninos, antraquinonas e β -sitosterol. Diante da importância dos seus usos, torna-se fundamental a análise de constituintes minerais, do seu perfil antioxidante e seus efeitos toxicológicos visando garantir a segurança no uso. Sendo assim, este trabalho teve como objetivo determinar a ocorrência de nutrientes minerais nos cladódios através da espectrometria de absorção atômica; análises de parâmetros oxidativos como quantidade de radicais livres totais, peroxidação lipídica e quantidade de proteínas carboniladas; avaliações genotoxicológicas do extrato frente à cultura de leucócitos humanos, através da viabilidade e proliferação celular, teste de micronúcleo e dano ao DNA. Assim como, citotoxicidade do extrato frente à cultura de CHO e NCTC. Observou-se que os cladódios de *Nopalea cochenillifera* apresentam teor significativo de cálcio (6271,0 mg/100g), potássio (3849,0 mg/100g), magnésio (2998,0 mg/100g), zinco (14,7 mg/100g), ferro (7,29 mg/100g) e um baixo conteúdo de sódio (5 mg/100g). *N. cochenillifera* pode contribuir para os aportes de Ingestão Diária Recomendada considerando os valores necessários para um adulto saudável. O extrato de *Nopalea cochenillifera* agiu como agente antioxidante reduzindo e revertendo os efeitos causados pelo peróxido de hidrogênio. Em células de sangue periférico foi possível observar que as amostras não apresentaram efeito mutagênico, não causaram dano ao DNA e não causaram diminuição da viabilidade celular, não sendo genotóxica. *Nopalea cochenillifera* apresentou baixa citotoxicidade em células NCTC e CHO. Os dados obtidos contribuem para os estudos na área e podem ser utilizados como subsídios para elaboração de preparações farmacêuticas a base dessa substância.

Palavras chave: *Nopalea cochenillifera*, minerais, perfil oxidativo, genotoxicidade.

ABSTRACT

Doctoral Thesis
Postgraduate Program in Pharmaceutical Science
Federal University of Santa Maria

AUTHOR: Raquel Medina Martins Necchi
ADVISER: Melânia Palermo Manfron
Presentation date: Santa Maria, 15 august 2016

Nopalea cochenillifera (L.) Salm-Dyck occurs from Mexico to Panama and is acclimatized in several countries. It is a shrubby plant that reaches 3-4 m tall, has a cylindrical body and items called cladodes. This species is known by names such as "sweet palm" and "little palm". It is used as human food and in traditional medicine as anti-inflammatory, analgesic, hypoglycemic, lipid-lowering, antimicrobial and diuretic. In cladodes of *N. cochenillifera* are presents flavonoids, saponins, tannins, anthraquinones and β sitosterol. Given the importance of its uses, it is essential to the analysis of mineral constituents, their antioxidant profile and their toxicological effects to ensure safe operation. Thus, this study aimed to determine the occurrence of mineral nutrients in the cladodes by atomic absorption spectrometry; analysis of oxidative parameters like amount of total free radicals, lipid peroxidation and amount of protein carbonyls; genotoxicological assessments of the extract in the human leukocytes culture, by cell viability and proliferation, micronucleus test and DNA damage, also extract cytotoxicity culture of CHO and NCTC cells. It was observed that the cladodes of *Nopalea cochenillifera* have a significant calcium content (6271.0 mg/100g), potassium (3849.0 mg/100g), magnesium (2998.0 mg/100g), zinc (14.7mg/100g), iron (7.29 mg/100g) and a low sodium content (5mg/100g). *N. cochenillifera* can contribute to the Recommended Daily Intake considering the amounts needed for a healthy adult. This extract acted as antioxidant agent, reducing and reversing the effects caused by hydrogen peroxide. In peripheral blood cells was observed that the samples showed no mutagenic effect, didn't cause DNA damage or decrease in cell viability, not being genotoxic. *Nopalea cochenillifera* showed low cytotoxicity on NCTC and CHO cells. The data obtained cooperate with the studies in the field and can be used as inputs for the preparation of pharmaceutical preparations with this substance

Keywords: *Nopalea cochenillifera*, minerals, oxidative profile, genotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

1 INTRODUÇÃO

FIGURA 1- *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick Cactaceae).....15

2 REVISÃO DA LITERATURA

FIGURA 2- Mecanismo de ação dos antioxidantes rimários.....35

FIGURA 3- Avaliação da viabilidade celular de leucócitos medido pelo corante azul tripan.....39

FIGURA 4- Avaliação da frequência de Micronúcleos.....41

FIGURA 5- Análise da medida de Dano DNA.....43

3 MANUSCRITOS

3.1 MANUSCRITO I

FIGURE 1– *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dick.....48

3.2 MANUSCRITO II

FIGURE 1- *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dick.....73

FIGURE 2- Relative concentrations of free radicals in different concentrations of the extract *Nopalea cochenillifera*. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$).....74

FIGURE 3 -Test Results - Lipid peroxidation in plasma; damage induced by H₂O₂ 10μM. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results (p<0.05).....75

FIGURE 4- Plasma protein carbonyls dosage results; with damage induced by H₂O₂ at 10μM. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results (p <0.05).....76

FIGURE 5 - Effects of *Nopalea cochenillifera* on human leukocyte cultures. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results (p <0.05).....77

FIGURE 6- Leukocyte cell viability measured by trypan blue dye after exposure to different concentrations of *Nopalea cochenillifera*. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results (p <0.05).....78

FIGURE 7 - Effects of *Nopalea cochenillifera* on the production of micronuclei in cell cultures. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results (p <0.05).....79

FIGURE 8 - Result of the comet assay in human leukocytes. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results (p <0.05).....80

LISTA DE TABELAS

3.1 MANUSCRITO I

TABLE 1- Instrumental parameters for element determination.....49

TABLE 2 - Regression parameters of the metal analytical curves.....51

TABLE 3 - Method precision for the selected mineral and accuracy evaluated using a certified reference material (egg powder, NIST RM 8415).....52

TABLE 4- Dietary Reference Intake (DRI) or Adequate Intake (AI) to mineral and its concentrations in *Nopalea cochenillifera*. Quantity of plant necessary to consume 100% of DRI.....53

3.2 MANUSCRITO II

TABLE 1 - IC_{50} of *Nopalea cochenillifera* extract against NCTC and cells CHO.....81

LISTA DE ABREVIATURAS

AI	Ingestão adequada
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartatoaminotransaminase
CAT	Catalase
CHO	Células de Ovário Chinês
DCFH-DA	Diacetato de diclorofluoresceína
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNPH	2,4 Dinitrofenilhidrazina
ERO	Éspecie Reativa de Oxigênio
GPx	Glutathione Peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IC ₅₀	Índice de Citotoxicidade
IDR	Índice de Recomendação Diária
LOD	Limite de detecção
MAD	Malondialdeído
MIC	Concentração Inibitória Mínima
MN	Micronúcleo
Nc	<i>Nopalea cochenillifera</i>
NCTC	Células do tecido conectivo de camundongo
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Tampão fosfato pH 7,4
RSD	Desvio Padrão Relativo
SOD	Superóxido Dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UV	Ultravioleta
VIS	Visível

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
1.2 OBJETIVOS.....	16
1.2.1 Objetivos gerais.....	16
1.2.2 Objetivos específicos.....	16
2 REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1 Considerações botânicas.....	17
2.2 Distribuição geográfica.....	17
2.3 <i>Nopalea cochenillifera</i> (L.) Salm Dick.....	18
2.4 Usos populares e atividades biológicas.....	19
2.5 Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos.....	20
2.6 Constituintes químicos.....	22
2.6.1 Polifenóis e flavonoides.....	23
2.7 Atividades biológicas.....	23
2.7.1 Atividade anti-inflamatória.....	24
2.7.2 Atividade antimicrobiana.....	24
2.7.3 Atividade hipoglicemiante.....	25
2.7.4 Atividade hipolipidêmica.....	25
2.8 Determinação de minerais em plantas.....	28
2.8.1 Espectrofotometria de absorção atômica.....	29
2.9 Estresse Oxidativo e danos celulares.....	30
2.9.1 Radicais livres.....	30
2.9.2 Peroxidação lipídica.....	32
2.9.3 Proteínas Carboniladas.....	33
2.10 Antioxidantes.....	34
2.11 Toxicidade das plantas.....	36
2.12 Genotoxicidade.....	37
2.12.1 Proliferação celular	38
2.12.2 Viabilidade celular.....	38
2.12.3 Frequência de Micronúcleos.....	39
2.12.4 Dano DNA.....	41
2.13 Citotoxicidade.....	43

3 MANUSCRITOS

3.1 MANUSCRITO I..... 45

3.1 Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, and iron in *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dick (Cactaceae) by flame atomic absorption spectrometry 46

3.2 MANUSCRITO II..... 59

3.2 Genotoxicity and oxidative of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick (Cactaceae)..... 60

4 DISCUSSÃO GERAL..... 82

5 CONCLUSÕES..... 87

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... 88

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde (OMS) relata que 82% da população mundial utiliza alguma forma de medicina tradicional para seus cuidados primários de saúde, como uso de extratos de plantas ou de seus princípios ativos (MORRIS et al., 2012). O uso de plantas medicinais, através das mais variadas formas de preparo e razões de uso, é amplamente difundido. Porém, a popularização da utilização, somada à facilidade de acesso, leva ao surgimento de alguns problemas, tais como: falta de informações adequadas sobre as propriedades das ervas medicinais, possibilidade de interações medicamentosas no consumo concomitante com medicamentos e outras espécies vegetais, problemas na identificação botânica e desconhecimento sobre os possíveis efeitos adversos (MACEDO et al., 2007; VEIGA, 2008).

Os estudos direcionados para a investigação da eficácia e segurança das espécies relatadas pelo uso popular proporcionam descoberta de novos compostos farmacologicamente ativos, assim como, informações necessárias para a garantia do uso correto, proporcionando maior eficácia e segurança na sua utilização (MALHEIROS, 2014).

Apesar da maioria dos medicamentos serem de origem sintética, os fármacos provenientes de plantas ocupam um lugar importante na medicina moderna (GUERRA et al., 2001). As plantas medicinais atuam como fontes de agentes terapêuticos, modelos para novos medicamentos sintéticos ou ainda como material de partida para a produção semi-sintética de moléculas de alta complexidade, promissoras no tratamento de diversas doenças (BRUSCHI et al., 2000).

A utilização das plantas medicinais na alimentação com intuito nutritivo e terapêutico vem aumentando ao longo dos anos. Alguns nutrientes minerais presentes em plantas possuem um papel preventivo no combate a diversas doenças (SILVA et al., 2010). A determinação do teor de minerais presentes em plantas medicinais é imprescindível para o uso adequado na nutrição humana (FERNANDEZ et al, 2002; ALMEIDA et al 2002). Atualmente vivencia-se um período de aumento na ingestão de alimentos gordurosos, refinados e ricos em açúcares e um baixo consumo de frutas e hortaliças (ROCHA et al., 2008). As hortaliças não convencionais são alternativas alimentar e uma opção de diversificação cultural, na atividade agropecuária, sobretudo na agricultura familiar, para populações rurais e urbanas de baixa renda (ROCHA et

al., 2008). Porém, a falta de informação por parte da população quanto ao seu valor nutricional faz com que seu consumo seja reduzido (SOUZA et al., 2009).

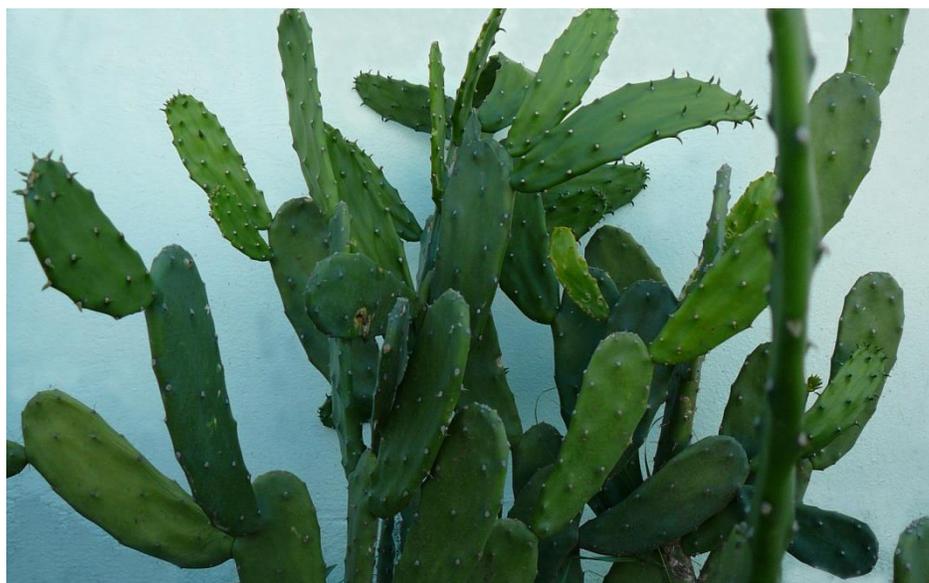
Os vegetais produzem os chamados metabólitos secundários, como os flavonoides, alcaloides, fenóis e terpenos, que tem a capacidade de reagirem com outros organismos no ambiente. Estes metabólitos secundários das plantas, anteriormente sem atividades farmacológicas conhecidas, estão sendo profundamente usados e investigados pelas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética e pesticida (SENGUL et al., 2009). Atualmente, pesquisadores têm focado nas plantas medicinais para extrair antioxidantes naturais e de baixo custo para substituir aditivos sintéticos que podem ter efeitos tóxicos, carcinogênicos e anormais nos seres humanos. Portanto, há um crescente interesse nestas substâncias pelos seus potenciais usos como antioxidantes em alimentos e na indústria farmacêutica (GÖKTÜRK et al., 2007; DOUGHARI et al., 2008). Os antioxidantes são capazes de diminuir ou inibir a oxidação mesmo quando presente em baixas concentrações em relação a seu substrato. Assim, estes compostos protegem o sistema biológico dos efeitos deletérios da oxidação de macromoléculas (PÉREZ-MATUTE et al., 2009; WILKING et al., 2012).

O estudo detalhado sobre a caracterização química e toxicologia das plantas consumidas são relevantes para o uso seguro e racional. Muitas plantas podem possuir propriedades farmacológicas e, simultaneamente, causar efeitos tóxicos, como danos ao DNA (MARQUES et al., 2003). Este conhecimento contradiz a falsa ideia de que drogas naturais, preparadas por produtos derivados de plantas, são seguras e isentas de efeitos adversos (CALIXTO, 2000). Vários métodos *in vitro*, podem ser usados para avaliar a toxicidade de extratos em culturas celulares. Estes testes de citotoxicidade consistem em colocar o extrato em contato com uma cultura de células, verificando as alterações celulares por diferentes mecanismos (ROGERO et al., 2000). A genotoxicidade é uma especialidade recente, e se situa na interface entre a toxicologia e a genética, por isto frequentemente denominada de genética toxicológica. Esta visa o estudo dos processos que alteram a base genética da vida, quer seja na sua estrutura físico-química, o ácido desoxirribonucleico (DNA), processo classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético a níveis celulares e orgânicos, identificados, respectivamente, como carcinogênese e teratogênese (SILVA et al., 2003). As inúmeras técnicas que detectam danos no DNA tem sido utilizadas para identificar substâncias com atividade genotóxica (TICE et al., 2000).

O Brasil tem grande biodiversidade apresentando também uma grande tradição no uso de plantas medicinais. Esta conjunção estabelece um cenário promissor para o desenvolvimento de pesquisas que visam à descoberta de novos fármacos a partir de espécies nativas (LEITE, 2009).

A seleção de uma espécie vegetal para a pesquisa pode ser baseada nas alegações de um efeito terapêutico em humanos, constituindo um valioso atalho para a descoberta de fármacos. O seu uso tradicional pode ser uma pré-triagem quanto à utilidade terapêutica (ELISABETSKY, 2006). Entre as inúmeras espécies vegetais de interesse medicinal encontram-se as plantas do gênero *Nopalea*, que apresenta diversos usos na medicina popular como, anti-inflamatório, analgésico, hipoglicemiante e cicatrizante, assim como na alimentação humana (CETTO; HEINRICH, 2005; GOMEZ-FLORES et al., 2006; LANS, 2006; ALONSO-CASTRO et al., 2012; FABELLA-ILLESCAS, 2015). Diante disso, pretende-se determinar a composição mineral de *Nopalea cochenillifera* (figura 1), determinar perfil oxidativo e a toxicidade *in vitro*.

Figura 1- *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick (Cactaceae)



1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho é determinar nutrientes minerais nos cladódios de *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick, o perfil oxidativo e toxicidade através de ensaios *in vitro*.

1.2.2 Objetivos específicos

- Determinar os teores de cálcio, magnésio, potássio, sódio, ferro e zinco nos cladódios de *N. cochenillifera*;

- Avaliar o estresse oxidativo através de parâmetros de peroxidação lipídica, quantidade de proteínas carboniladas e quantidade de radicais livres totais;

-Determinar a anti-genotoxicidade do extrato de *N. cochenillifera* frente à cultura de leucócitos humanos induzidas com peróxido de hidrogênio através de viabilidade e proliferação celular, teste de micronúcleos, o teste de dano ao DNA;

-Determinar a citotoxicidade do extrato de *N. cochenillifera* frente às células de ovário de hamster chinês (CHO) e células do tecido conectivo de camundongo (NCTC) clone 929.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Considerações botânicas

A família Cactaceae consta de cerca de 84 gêneros e 2000 espécies. No Brasil, estão relacionados em torno de 32 gêneros, com cerca de 160 espécies distribuídas em todas as regiões. São plantas xerófitas, cuja evolução está baseada no princípio de redução das partes vegetativas. São plantas perenes, suculentas, de hábito variável, geralmente espinhosas. O caule é dividido em artículos, que constituem os cladódios. Estes podem ser planos, cilíndricos, colunares ou globosos. Os espinhos são modificações foliares, muito variáveis na forma, cor, dimensões e disposição, reunidos em um ponto saliente ou deprimido que constitui a aréola. As aréolas são órgãos peculiares e complexos, de onde se originam ramos, folhas, flores, espinhos, gloquídias, pêlos e glândulas (BARROSO et al., 2002).

A família está dividida em 3 tribos, que subordinam um número relativo de gêneros: Tribo *Pereskieae*, *Opuntieae*, *Cereae*, sendo que *Nopalea cochenillifera* pertence à tribo *Opuntieae* (BARROSO et al., 2002).

2.2 Distribuição geográfica

As Cactaceae estão distribuídas desde a Patagônia na Argentina até o Canadá em vários habitats, incluindo desertos nus, quentes, extensões litorâneas arenosas, florestas decíduas, e até mesmo em florestas tropicais (BARTHLOTT; HUNT, 1993).

Os centros de diversidade da família compreendem regiões áridas das América do Sul e do Norte notavelmente os Estados Unidos, o sudoeste do México, Brasil Oriental, e os declives orientais e ocidentais dos Andes sul americano. Apenas uma única espécie epifítica *Rhipsalis baccifera*, tem uma gama de distribuição que naturalmente estende para a África do Sul, Madagáscar e Sri Lanka (BARTHLOTT, 1983).

No Brasil, há dois grupos de Cactaceae distintos, um da região Nordeste e outro das regiões Sul e Sudeste, sendo a Bahia o Centro de dispersão. As espécies nordestinas têm afinidade com as norte-americanas, enquanto as do Sul e Sudeste se assemelham mais as sul-americanas (BARROSO et al., 2002).

2.3 *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck

Nopalea cochenillifera ocorre do México ao Panamá e encontra-se aclimatada em diversos países (HUNT ;TAYLOR 1990; BARBOSA et al., 1996). Esta cactácea é uma planta arbustiva que atinge 3 a 4 m de altura, possui tronco cilíndrico e com artículos denominados cladódios que são achatados e carnosos, assumindo uma disposição que possibilita a projeção de sombra uns aos outros. Seu mecanismo de sombreamento é relevante, uma vez que ocorrem em lugares abertos, de sol pleno e com temperaturas elevadas. O tipo de caule caracteriza-se por realizar o processo de fotossíntese tipo Metabolismo do Ácido das Crassuláceas (CAM) uma vez que as folhas estão reduzidas a espinhos pela xeromorfia (SOUZA; LORENZI, 2005).

É encontrada como planta isolada ou em grupos, formando grandes cultivares. Multiplica-se por sementes ou por estaquia dos artículos, prefere sol pleno, solos arenosos e tolera solos pobres, mas drenados. Esta espécie é conhecida popularmente por denominações como palma-miúda, palma-doce, urumbeta, cardo-de-cochonilha, nopal e nopalito (SOUZA; LORENZI, 2005). A palma forrageira pertence a Ordem: *Opuntiales*; família: *Cactaceae*; subfamília: *Opuntioideae*; gênero: *Opuntia* e *Nopalea*. No Nordeste do Brasil, são cultivadas três espécies, conhecidas como palma gigante (*Opuntia ficus-indica*), palma redonda (*Opuntia sp*) e a palma miúda (*Nopalea cochenillifera*) (MAIA NETO, 2000).

2.4 Usos populares e atividades biológicas

Mundialmente, a palma miúda é usada na alimentação humana e de animais, como fonte de energia, na medicina popular, na indústria de cosméticos, na proteção e conservação do solo, dentre outros usos como para a fabricação de colas, papel, corantes, mucilagem, antitranspirantes e ornamentação (BARBERA, 2001).

O uso dos cladódios de *Nopalea cochenillifera* na alimentação humana ocorre principalmente no México e outros países com influência mexicana com relatos de mais de 200 receitas à base de palma forrageira (FLORES, 2001; GUEDES et al., 2004). Nos EUA e alguns países da Europa e da Ásia, as receitas são consumidas esporadicamente como alimento exótico.

No Brasil, em alguns municípios do Sertão baiano e da Chapada Diamantina, a palma também está inserida na alimentação (GUEDES et al., 2002). Além da alimentação humana, em períodos de seca, os seus cladódios são relatados como forrageira para vacas, ovelhas e cabras no Brasil, Chile, Califórnia, Marrocos, México, África do Sul, Texas e Tunísia (FELKER et al., 1997). As palmas são comumente consumidas frescas ou cozidas no México e parte dos Estados Unidos, e apresentam em sua constituição 92 % de água, 4-6 % de carboidrato, 1 % de proteína, 0,2 % de gordura, 1 % de minerais, vitamina C (12,7 mg/100g) e β -caroteno (12,9 μ g/100g) (FRATI-MUNARI et al., 1989).

Entre os diversos usos e aplicações das palmas forrageiras, está a produção do corante carmim, de alto valor comercial, produzido pelo inseto do grupo dos coccídeos, a cochonilha *Dactylopius coccus*, que utiliza a palma como planta hospedeira (BARBERA, 2001). Tanto a cochonilha como o carmim são utilizados como corante vermelho nas indústrias alimentícias, farmacêutica, cosmética e no tingimento de lã. O inseto é um parasita específico das espécies do gênero *Nopalea* e *Opuntia* (FLORES-FLORES; TAKELENBURG, 2001).

As cactáceas são vegetais amplamente utilizados na medicina tradicional por curandeiros e tribos indígenas no México. São principalmente utilizados como analgésicos, antimicrobianos, diuréticos, para problemas intestinais, tosses, alterações cardíacas e neurológicas, para curar alguns tipos de úlceras e no controle de diabetes e colesterol (HOLLIS; SHEINVAR, 1995; SÁENZ HERNÁNDEZ, 2001). Em medicina tradicional *N. cochenillifera* é utilizada como diurético, anti-inflamatório e analgésico, em particular para dor de ouvido e de dente, no

tratamento de hipertensão e cálculos renais e como agente hipoglicemiante (PARK et al., 2001; LANS, 2006; CETTO; HEINRICH, 2005;). As palmas apresentam várias atividades biológicas, dentre elas anti-inflamatória, antimicrobiana, hipoglicemiante e antilipidêmico.

2.5 Aspectos morfoanatômicos e histoquímicos

A análise morfoanatômica de espécies vegetais permite verificar a autenticidade de insumos e auxilia na geração de fitoterápicos com qualidade. Os caracteres morfoanatômicos são importantes para a diagnose de gêneros e espécies de Cactáceas (MAUSETH, 1989; SILVA; ALVES 1999; SOFFIATTI; ANGYALOSSY 2003). Entre as espécies do gênero *Nopalea* as espinescências são marcadores morfológicos consistentes, pois em *Nopalea dejecta*, por exemplo, os espinhos são grandes, enquanto que em *N. cochenillifera* os espinhos são pequenos, retos e hialinos (BARROSO et al., 2002). O caule das cactáceas, apresenta-se verde, revestido por espinhos de forma, cor, dimensão e disposição variáveis reunidos em aréolas, substituindo as folhas (BARROSO et al., 2002). A forma variável, caracterizada em um gênero constituído basicamente por um eixo globoso ou alongado (*Melocactus*, *Notocactus*), ou alongado e com gomos (*Cereus*, *Pilosocereus*) ou achatado no plano do eixo maior e segmentado (*Opuntia*, *Epiphillum*) ou ainda, excepcionalmente cilíndrico (*Rhipsalis*) (JOLY, 2002).

Assim como as características morfológicas, as características anatômicas como o padrão da forma das células epidérmicas e dos estômatos, o tipo de espessamento das paredes celulares do colênquima, a localização de feixes vasculares e o tipo dos mesmos, bem como a localização de estruturas secretoras são caracteres microscópicos úteis na diagnose de gêneros e espécies de cactáceas (METCALFE;CHALK, 1950; CONDE 1975; MAUSETH 1989, SILVA; ALVES 1999; SOFFIATTI; ANGYALOSSY 2003). De acordo com Arruda et al., (2005) as cactáceas *Harrisia adscendens* e *Tacinga palmadora* apresentam células epidérmicas com parede celular sinuosa e ondulada, respectivamente (ARRUDA et al., 2005). Esta característica mostra a importância dessa variabilidade para o controle de qualidade destas drogas. Outra característica relevante é o número de camadas celulares da epiderme (MAUSETH, 2005). Arruda et al., (2005) demonstraram que a cactácea *Harrisia adscendens* apresenta colênquima do tipo lamelar

enquanto que as espécies do gênero *Tacinga* exibem células colenquimáticas do tipo angular. Mauseth (2005) destaca a diferença da quantidade de células do parênquima paliçádico, havendo diferenças significantes dentro de um mesmo gênero.

A variedade na forma, na constituição química e a localização dos cristais nos tecidos vegetais é um elemento de autenticidade de drogas (CUTTER, 1987; FAHN, 1990; DICKSON, 2000; GARCIA, 2004). A capacidade de muitas plantas para sintetizar metabólitos secundários, como compostos fenólicos, alcalóides e antocianina, está associada com sua disposição anatômica (AZEVEDO, 1998). A histoquímica das plantas permite detectar a presença desses metabólitos, que poderão ser quantificados, em função da intensidade observada (SANTOS et al., 2009).

Segundo Arruda et al., (2005) as espécies do gênero *Melocactus* apresentam cristais prismáticos nos cladódios, enquanto *Harrisia adscendens* os cristais são ausentes. As estruturas de mucilagem são mencionadas como um dos caracteres adaptativos das cactáceas ao ambiente xérico, uma vez que estas são metabólitos relacionados ao armazenamento de água (SILVA; ALVES, 1999; DICKSON, 2000; SOFFIATTI; ANGYALOSSY, 2003). Estas estruturas são consideradas como um caráter útil na separação entre as subfamílias Cactoideae e Opuntioideae de Cactaceae, pois em Cactoideae ocorrem unicamente células mucilaginosas, enquanto que em Opuntioideae ocorrem células e canais secretores de mucilagem (ARRUDA et al., 2005).

Necchi et al., (2010) realizaram estudo morfoanatômico e histoquímico nos cladódios de *N. cochenillifera* permitindo a autenticidade da planta como futuro insumo fitoterápicos. Foi possível verificar que a forma dos cladódios, a superfície glabra e ondulada deles; as aréolas com três espinhos retos; os padrões de espessura da parede celular do colênquima, o número de camadas do parênquima, a presença de uma epiderme uniseriada, os tipos de estômatos, bem como a forma e a localização da mucilagem são caracteres importantes como marcadores morfoanatômicas de *N. cochenillifera*. Esses recursos, quando tomado juntos, permitem a sua autenticidade e diferenciação de outra espécie.

2.6 Constituintes Químicos

Nos cladódios de *N. cochenillifera* estão presentes flavonoides, saponinas, taninos, antraquinonas e β -sitosterol (GOMEZ-FLORES et al., 2006). Necchi et al., (2010) verificaram através de ensaios histoquímicos nos cladódios a presença de flavonoides na região do colênquima. Necchi et al., (2012) verificaram o que o extrato hidroetanólico de *N. cochenillifera* apresenta teor significativo de 29,62 % \pm 1.356 de polifenóis totais quando comparado a padrão de ácido gálico, e um percentual de 7,63 % \pm 0,075 de flavonóides comparado ao padrão rutina.

Guevara-Figueroa et al., (2010) analisaram diferentes espécies de *Opuntia spp.* e identificaram os flavonoides, iso-quercitina, nicotiflorina, rutina e narcissina, sendo que nicotiflorina e narcissina foram predominantes. Nos cladódios de *Opuntia dilenii* foram identificados diversos flavonoides dentre eles, campferol, miricetina, vitexina e orientina (QIU et al., 2002; AHMED, 2005).

Lee et al., (2003) isolaram nos cladódios de *Opuntia ficus-indica* os compostos quercetina, campferol e ácido cumarínico. Luo et al., (2010) analisaram o extrato hexânico de *Opuntia milpa alta* (Cactaceae) em Cromatografia Gasosa e espectrometria de massa e identificaram 36,03% de fitosterol, 18,57% de ácidos graxos poliinsaturados, 12,28% de fitol, 13,54% de ácido palmítico e 4,51% de vitamina E. Os metabólitos secundários variam de acordo com a família, gênero e espécie, muitas vezes por suas restrições, tornam-se determinantes, tornando-se um marcador taxonômico (BENETT, WALLSBROVE, 1994).

Jaramillo-Flores, et al., (2003) investigaram o perfil de carotenóides nos cladódios fresco de *Opuntia ficus indica* e verificaram a presença de acriptoxantina (20%), β -caroteno (36%) e luteína (44%). São atribuídas aos flavonoides diversas atividades biológicas, entre elas, hipoglicemiantes. Alguns flavonóides aumentam a liberação de insulina das ilhotas de Langerhans de forma dependente de sua concentração (KOSHY, VIJAYSLAKSHMI et al., 2001).

2.6.1 Polifenóis e Flavonoides

Os polifenóis são moléculas com conhecidas propriedades antioxidantes, dentre eles estão os flavonoides que possuem estrutura ideal para o sequestro de radicais sendo antioxidantes mais efetivos que as vitaminas C e E (BARREIROS et al., 2006). Nas últimas décadas, o interesse pelos compostos fenólicos vem aumentando devido suas estruturas e ações protetoras nas plantas, principalmente ação antioxidante contra as espécies reativas de oxigênio. Os compostos fenólicos são um dos maiores grupos de metabólitos secundários, divididos de acordo com o número de anéis fenóis e os outros elementos de suas estruturas (PROESTOS et al., 2005). O nome polifenóis vem da nomenclatura poli que significa muitos e de fenol, o qual é constituído por um anel aromático ligado a uma hidroxila (-OH). A estrutura de um polifenol deve apresentar mais de um anel aromático, tendo cada um, pelo menos uma hidroxila ligada. Nas plantas, os polifenóis agem, principalmente, na proteção contra raios UV e ataques de microorganismos e herbívoros, tendo um importante papel no crescimento e reprodução das plantas (IGNAT, 2011). Nos animais apresentam uma vasta gama de propriedades farmacológicas como antialérgica, anti-aterogênica, anti-inflamatória, antiviral, antifúngica, antitrombótica, cardioprotetora e vasodilatadora (BALASUNDRAM et al., 2006). Os polifenóis tem despertado a atenção dos pesquisadores devido a suas ações antioxidantes, antiateroscleróticas, hipoglicemiantes e anticancerígenas (MACHADO et al., 2008).

Os flavonoides são amplamente distribuídos no reino vegetal e representam um dos grupos fenólicos mais importantes e diversificados (SIMÕES, 2004). Barnes et al., (2001) indicaram, como principais fontes deste grupo, frutos como uvas, cerejas, maçã, groselhas, frutas cítricas e hortaliças, tais como pimenta, tomate, espinafre, cebola e brócolis. A estrutura fundamental é composta por 15 átomos de carbono, dispostos em C₆-C₃-C₆, sendo dois anéis fenólicos e um pirano. A biossíntese dos flavonoides ocorre pela combinação das rotas do chiquimato e acetato (LEITE, 2009). A atividade antioxidante dos flavonoides depende da sua estrutura e pode ser determinada por cinco fatores (CERQUEIRA et al., 2007) como: reatividade como agente doador de hidrogênio e elétrons, estabilidade do radical flavonoil formado, reatividade frente a outro antioxidante, capacidade de quelar metais de transição e solubilidade para melhor interação com as membranas (CERQUEIRA et al., 2007; BARREIROS et al., 2006).

2.7 Atividades biológicas

As palmas apresentam várias atividades biológicas, dentre elas efeito anti-inflamatório antiglicêmico, antilipidêmico, diurético e antimicrobiano.

2.7.1 Atividade Anti-inflamatória

O extrato aquoso dos frutos de *Opuntia dillenii*, apresenta atividade anti-inflamatória aguda pelo método de indução de carragenina (LORO et al., 1999 AHMAMED et al., 2005). Park e colaboradores (2001) demonstraram que o extrato etanólico dos cladódios de *O. ficus-indica* apresenta atividade anti-inflamatória pelo o método de indução de granuloma em ratos.

Necchi et al., (2011) demonstraram atividade anti-inflamatória no extrato hidroetanólico de *Nopalea cochenillifera* pelo método de indução do granuloma quando comparado a nimesulida. Os animais tratados com o extrato apresentaram 53,5% de inibição da formação de tecido granulomatoso, enquanto o grupo controle apresentou 58,5%, confirmando a atividade anti-inflamatória significativa. Além disso, os pesquisadores avaliaram a toxicidade renal e hepática através de dosagem de marcadores bioquímicos, como creatinina, uréia aspartato aminotransaminase (AST), alanina aminotranferase (ALT) e albumina. Foi possível verificar ausência de toxicidade, pois não houve elevação significativa de marcadores bioquímicos em relação ao controle negativo.

2.7.2 Atividade Antimicrobiana

Estudos *in vitro* por método colorimétrico demonstraram que *N. cochenillifera* apresenta atividade antimicrobiana frente à *Escherichia coli*, *Salmonella enterica* e *Candida albicans* (GOMEZ-FLORES et al., 2006).

Necchi et al., (2012) testaram atividade antimicrobiana do extrato hidroetanólico de *Nopalea cochenillifera* pelo método de bioautografia e microdiluição em caldo. O extrato apresentou uma concentração inibitória mínima (MIC) significativa frente aos microorganismos *Micrococcus*, *Staphylococcus aureus*, *Candida glabrata*, *Candida albicans*; *Prototheca zopffi*; *Cryptococcus neoformans*, *Saccharomyces cerevisiae* e *Malassezia furfur*.

2.7.3 Atividade hipoglicemiante

Dentre os principais usos populares das cactáceas destaca-se o uso no tratamento do *Diabetes mellitus*. Na década de 1980 e no início da década de 1990, um grupo de pesquisadores realizou vários estudos em seres humanos utilizando *Opuntia streptacantha* (Cactaceae) e tiveram redução da glicemia com pico do efeito em 3 horas após a administração, com uma ação sustentada após 6 horas (FRATI-MUNARI et al., 1988; FRATI-MUNARI et al., 1989).

Andrade-Cetto e Wiedenfeld (2011) verificaram um efeito anti-hiperglicêmico do extrato de *O. streptacantha* (Cactaceae) através do teste oral de tolerância a glicose (TOTG) em ratos diabéticos induzidos pela estreptozotocina quando comparado a acarbose. Estudos anteriores indicam que o efeito anti-hiperglicêmico deve-se ao teor de fibras, pectina e mucilagem que podem reduzir absorção de glicose (SHANE-MCWHORTER, 2005).

Estudos demonstram que a administração oral diária de extratos de *Opuntia megacantha* Salm Dyck (Cactaceae) em ratos diabéticos e não-diabéticos foi associada à redução da concentração de glicose no plasma sem afetar os níveis de insulina. Estes resultados sugerem que o efeito hipoglicemiante envolva mecanismos de ação que não utilizam a insulina (BIWITITI et al., 2000).

Laurenz et al., (2003) administraram o extrato *O. lindheimeri* (Cactaceae) via oral nas doses 0, 250 a 500 mg/kg em porcos diabéticos induzidos por estreptozotocina e verificaram efeito hipoglicemiante dentro de 1 hora de administração, com os efeitos máximos ocorrendo a 4 horas após a administração.

Trejo-Gonzalez et al., (1996) administraram o extrato purificado de *O. fuliginosa* (Cactaceae) em ratos diabéticos induzido e verificaram que os níveis de glicose no sangue foram

reduzidos a valores normais inicialmente empregando o extrato mais insulina. Os efeitos hipoglicêmicos do extrato tornou-se significativo após a interrupção da insulina no grupo tratado, e os valores de normoglicêmicos foram mantidos unicamente pela administração do extrato de palma.

Godard et al., (2010) demonstram efeito hipoglicemiante agudo de OpunDia™, uma preparação comercial feita a partir de extratos de frutas e cladódios de *Opuntia ficus-indica*, em pacientes diabéticos tipo 2 após um teste oral de tolerância à glicose. Frati-Munari et al., (1990) demonstram que *O. ficus-indica* obteve a mesma atividade hipoglicêmica. Estudos recentes de Butterweck et al., (2011) verificaram que o extrato aquoso de *O. ficus-indica* reduziu os níveis glicêmicos em ratos diabéticos em doses de apenas 6mg/Kg. Efeitos semelhantes com doses de 1 mg/kg foi relatado com o extrato purificado *Opuntia fuliginosa* (TREJO-GONZALEZ et al., 1996). As variações na resposta hipoglicêmica variam entre as espécie de *Opuntia* uma vez que os princípios ativos são diferentes entre as elas (ENIGBOKAN et al, 1996; BWITITI et al, 2000). Além das atividades hipoglicemiantes, Galati et al., (2002) demonstraram que *O. ficus-indica* aumenta significativamente a diurese em ratos. Os autores atribuem a ação aos compostos polares encontrados na amostra (flavonoides glicosilados e ácido ascórbico). Estes compostos podem agir sinergicamente ou individualmente na vasodilatação (STANIC; SAMARZ, 1993).

São atribuídas aos flavonóides diversas atividades biológicas, tais como cardioprotetora e hipoglicemiante. Alguns flavonoides aumentam a liberação de insulina das ilhotas isoladas de Langerhans de forma dependente de sua concentração (KOSHY; VIJAYSLAKSHMI et al., 2001). Segundo Dok-go et al., (2003) os flavonoides presentes nos cladódios e nos frutos de *Opuntia spp.* possuem efeitos neuroprotetores em células cultivadas *in vitro* e ação antioxidantes na eliminação de radicais livres.

Luo et al., (2010) analisaram os extrato hexânico de *Opuntia milpa alta* (Cactaceae) em Cromatografia Gasosa e espectrometria de massa e identificaram 36,03% de fitosterol, 18,57% de ácidos graxos poliinsaturados, 12,28% de fitol, 13,54% de palmítico ácido e 4,51% vitamina E. O extrato hexânico de *O. milpa alta* apresentou diminuição significativa da glicemia em ratos diabéticos quando comparados ao controle positivo dimetilbiguanina.

Existe uma ampla variedade de fitoesteróis, os encontrados com mais frequência na natureza são β -sitosterol, campesterol e estigmasterol. Kim et al., (1996) demonstram que a mistura de campesterol (3,68%), estigmasterol (2,30%) e sitosterol (94,02%) reduziu o nível glicemia

quando administrado em doses de 10 e 20 mg/kg ip durante 4 dias após a injeção de estreptozotocina EV (180 mg/kg).

Os glicosídeos de triterpenóides e esteróides, os quais são conhecidos como saponinas, são substâncias bioativas presentes em muitas plantas (RAO; GURFINKEL, 2000). Algumas saponinas derivadas de triterpenóides possuem ação hipoglicemiante (CONNOLLY; HILL, 2001). O efeito hipoglicemiante das saponinas é atribuído ao consumo de glicose no intestino (YOSHIKAWA et al., 2001). Segundo Fort et al., (2000) as cumarinas também possuem atividade hipoglicemiante e efeito inibitório sobre a atividade da enzima aldose redutase e sobre a agregação plaquetária, as quais são consideradas como as causas das complicações diabéticas.

2.7.4 Atividades hipolipidêmicas

O extrato dos frutos *Opuntia sp.* reduz os níveis de lipoproteínas de baixa densidade (LDL) e aumento de lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma de cobaias (FERNANDEZ et al., 1990). Misawa et al., (2008) sugerem que os derivados fitoesteróis presentes em *Aloe vera* (Cactaceae) pode reduzir a acumulação de gordura visceral e ser útil no tratamento de hiperlipidemia e hiperglicemia. Os fitoesteróis são esteróis vegetais estruturalmente semelhantes ao colesterol que atuam no intestino diminuindo sua absorção. Recentemente, uma estudo clínico demonstrou que a propagação de fitosterol enriquecido é eficaz na redução de colesterol total e lipoproteínas de baixa densidade LDL colesterol em indivíduos com diabetes tipo 2. Embora este efeito seja modesto, pode contribuir para diminuir o risco de doença cardiovascular em tipo-2 diabetes (LEE et al., 2003).

Fernandez et al., (1990) verificaram que o extrato dos frutos *Opuntia sp.* reduz os níveis de LDL e aumenta os níveis de lipoproteína de alta densidade (HDL) no plasma de cobaias. Budinsky et al., (2001) demonstram que a ingestão de diário de *Opuntia robusta* por mais de quatro semanas diminuiu o colesterol total e LDL em um grupo de pacientes que sofrem de hipercolesterolemia.

Cardenas Medellin et al., (1998) administraram cladódios fresco e cozido de *Opuntia ficus-indica* em concentrações diferentes (aprox. 6 e 12%) em ratos por 30 dias. Após a

alimentação foi determinado os níveis de glicose, colesterol total, HDL, LDL e de lipoproteínas de muito baixa densidade (VLDL) no soro através de punção intracárdica. Os ratos alimentados com nopal cru a 12% tiveram uma redução de 34% nos níveis de colesterol e LDL. De acordo com Frati-Munari, et al., (1983) as fibras encontradas nos cactos não são digeridas pelas enzimas gastrointestinais e nem absorvidas, com isso não podem ser responsáveis por alterar a absorção de determinadas substâncias, tais como sais biliares, colesterol e glicose.

2.8 Determinação de minerais em plantas

As plantas medicinais contêm elementos que podem ser disponibilizados para o corpo humano em qualquer tipo de consumo. A importância de estudos que possibilitam conhecer os elementos minerais em plantas está em verificar possíveis interferências na sua ação terapêutica e também na recomendação como fonte de minerais na dieta alimentar (CHEN; PAN, 2001).

Existe muito interesse em estudar os minerais presentes nas plantas medicinais devido a possibilidades de uso na suplementação alimentar (LOPES et al., 2002; ANDRADE et al., 2005; DELAPORTE et al., 2005). O uso contínuo e compulsório de espécies vegetais no combate ou alívio de doenças motiva a determinação da composição inorgânica das plantas (MARTINS et al., 2009). Os sais minerais realizam diversas funções específicas no corpo humano estando relacionados com o bom desempenho do metabolismo de enzimas, as quais são responsáveis pela manutenção da saúde do organismo (DUARTE; PASQUAL, 2000). Entre os macronutrientes o cálcio e o magnésio participam da constituição da estrutura óssea, dentes e tecidos, e são necessários para ativação de enzimas que participam do processo de digestão dos alimentos, assim como, na permeabilidade seletiva da membrana plasmática (PINTO et al., 1999; LOPES et al., 2002). O zinco, ferro e cobre são necessários em pequenas quantidades pelo organismo, sendo por isso chamados de micronutrientes, no entanto, também indispensáveis na alimentação (FAVIER, 1991; KRAUSE; MAHAN, 1991). O zinco é um elemento importante para o crescimento, reprodução, cicatrização de ferimentos, ativação de reações catalisadas por enzimas antioxidantes, além de funções imunológicas (WHO, 1996). O ferro por fazer parte de moléculas

do sangue como hemoglobina e mioglobina é um nutriente indispensável no transporte de oxigênio e respiração celular (MACHADO et al., 2006).

2.8.1 Espectrofotometria de Absorção Atômica

A espectrometria de absorção atômica (AAS) é uma técnica bem estabelecida e é amplamente utilizada para a determinação de vários elementos. A AAS utiliza basicamente o princípio de que átomos livres (estado gasoso) gerados em um atomizador são capazes de absorver radiação de frequência específica, que é emitida por uma fonte espectral; a quantificação segue os princípios da lei de Beer (SKOOG et al., 1998). É considerada uma das principais ferramentas da química analítica para a quantificação de metais, devido à sua alta sensibilidade e seletividade. É uma técnica bem estabelecida e bastante utilizada em laboratórios de pesquisa (HARRIS, 2001). A espectrometria de absorção atômica em chama (FAAS) é uma técnica analítica bem estabelecida e suficientemente robusta para ser implantada em laboratório envolvido com análises químicas em larga escala. Por outro lado, erros sistemáticos e aleatórios podem prejudicar a exatidão e precisão dos resultados bem como o desempenho das técnicas analíticas em questão (WELZ; SPERLING, 1999). A espectrometria de absorção atômica com chama tem sua sensibilidade limitada por fatores como a dispersão dos átomos dos analitos gerados na chama, que passam rápida e continuamente através do caminho ótico durante a aspiração da amostra, e a baixa eficiência do sistema de nebulização pneumático que é de, no máximo, 10%. Porém, é uma técnica consolidada, sendo utilizada para determinações rotineiras de diversos metais em diversas amostras em função de ser uma técnica amplamente disponível, de baixo custo e fácil manutenção e operação (SKOOG et al., 1998).

Na atomização em chama uma alíquota da solução da amostra é convertida em aerossol no nebulizador e transportada para a chama (WELZ; SPERLING, 1999). As gotas que entram na chama evaporam e o aerossol sólido resultante também se evapora e se decompõe em átomos. Assim, a chama deve possuir temperatura suficiente não só para vaporizar a amostra, mas também para atomizá-la. A composição química da chama tem influência neste processo (HARRIS, 2001).

Na escolha da chama, os parâmetros mais importantes a serem considerados são a sua temperatura, a velocidade linear de queima e a razão entre o combustível e o oxidante (estequiometria da chama). As combinações mais comuns de oxidante/combustível, empregadas, atualmente, em absorção atômica são ar-acetileno e óxido nitroso-acetileno (WELZ; SPERLING, 1999).

Uma das desvantagens dos métodos espectroscópicos em chama é a necessidade de que a amostra seja introduzida na fonte de excitação em forma de uma solução, mais comumente uma solução aquosa. Para se obter a solução do analito, é geralmente necessário um tratamento preliminar da amostra que, geralmente, consome tempo e introduz mais erros do que aqueles próprios da medida espectroscópica. Além, disso os reagentes usados na decomposição de uma amostra podem introduzir interferências espectrais e não espectrais (SKOOG, et al., 1998).

2.9 Estresse oxidativo e danos celulares

2.9.1 Radicais livres

Os radicais livres são moléculas orgânicas e inorgânicas ou átomos que contêm um ou mais elétrons não pareados. São moléculas altamente instáveis, com meia vida curtíssima e muito reativa quimicamente. Alguns exemplos destes radicais são: $^1\text{O}_2$, O_2^- , OH^\cdot , NO^\cdot , ONOO^- . A formação dos radicais livres pode acontecer no citoplasma, nas mitocôndrias ou nas membranas.

O processo de formação *in vivo* ocorre via ação catalítica de enzimas, durante os processos de transferências de elétrons que ocorrem no metabolismo celular e pela exposição a fatores exógenos (LIOCHEV et al., 2013). Os processos endógenos que provocam a formação destes radicais livres são a respiração celular, inflamações, peroxissomos e citocromo P450. Os fatores exógenos que aumentam o risco de formação dos radicais livres são poluentes do ar, radiações gama e UV, medicamentos, dieta rica em ácidos graxos poli-insaturados e cigarro (BIANCHI; ANTUNES, 1999; PIETTA, 2000, SORG, 2004).

A concentração dos radicais livres pode aumentar devido à maior geração intracelular ou pela deficiência de mecanismos antioxidantes. O próprio organismo é capaz de combater as consequências habituais causadas pelos radicais livres, porém, há situações em que estes mecanismos de defesas não são suficientes para prevenir e reparar os danos causados por estas reações indesejáveis.

O conjunto de condições intra e extracelulares que leva à geração exacerbada de espécies reativas de oxigênio (EROs) é denominado estresse oxidativo (VALKO et al., 2004). Caracterizado como uma consequência da insuficiência do potencial antioxidante do organismo ou da exacerbção de processos que induzem uma maior formação de espécies oxidantes, resultando em danos oxidativos responsáveis por várias ações deletérias, tais como aumento nos níveis de peroxidação dos lipídeos da membrana, aumento na carbonilação de proteínas e até danos ao DNA intracelular (CHORILLI et al., 2007). As principais moléculas suscetíveis às EROs são lipídeos presentes nas membranas celulares, as proteínas e as moléculas de ácidos nucleicos, como DNA. O estresse oxidativo causado nas membranas é conhecido de um modo geral como peroxidação lipídica enquanto que o estresse oxidativo causado no DNA é classificado, de um modo geral como genotoxicidade (SANTOS MONTAGNER, 2010). Por isso, o estresse oxidativo tem sido relacionado na patogênese de diversas doenças, que variam de cardiovasculares, neurodegenerativas, alguns tipos de câncer, doenças neurológicas, pulmonares, autoimunes e vasculares, diabetes, problemas de visão bem como no processo de envelhecimento precoce (TOUR'É; XUEMING, 2010). Para se proteger do estresse oxidativo, o organismo dispõe do sistema de defesa contra radicais livres. O sistema enzimático é a primeira linha de defesa antioxidante, evitando o acúmulo do ânion radical superóxido e do peróxido de hidrogênio. É formado por diversas enzimas, destacando-se a Glutaciona peroxidase (GPx), Catalase (CAT) e a Superóxido dismutase (SOD) que atuam na redução das espécies reativas de oxigênio (EROs) e, conseqüentemente, evitam a oxidação de estruturas biológicas. Enquanto que o sistema não enzimático compreende os antioxidantes hidrofílicos (Glutaciona reduzida (GSH), vitamina C e polifenóis) e lipofílicos (bioflavonas, vitamina E e carotenóides) (VALKO et al., 2007; WILKING et al., 2012).

As espécies reativas podem ser formadas no organismo de diversos modos. Durante a fosforilação oxidativa, mecanismo usado pelas células para produzir energia química (ATP), parte dos elétrons é transferida para o oxigênio, dando origem ao $O_2^{\cdot-}$ (JUNQUEIRA; RAMOS,

2005). Eles podem ainda ser produzidos durante a oxidação de ácidos graxos, reações do citocromo P450 e de células fagocíticas, entre outros. Algumas enzimas também são capazes de gerar EROs, sob condições normais ou patológicas. Fontes exógenas como tabaco, radiações, luz ultravioleta, solventes e alguns fármacos, dentre outros, também geram EROs (BIESALSKI, 2002). A determinação da produção de oxidantes celulares pode ser verificada com o auxílio de 2',7'-diclorofluoresceína-diacetato (DCFH-DA), um composto lipossolúvel, originalmente não fluorescente, que após ser oxidado pelas ROS intracelulares é convertido em 2',7'-diclorofluoresceína (DCF), tornando-se insolúvel em meio lipídico, mantendo-se no interior da célula e fluorescente, a qual pode ser quantificada fluorimetricamente (ROYALL; ISCHIROPOULOS, 1993, HALLIWEL; GUTTERIDGE, 2000).

2.9.2 Peroxidação lipídica

As Espécies Reativas de Oxigênio podem atacar as membranas celulares, as quais contêm uma grande quantidade de ácidos graxos poliinsaturados. A peroxidação lipídica dá-se pela reação dos radicais livres com os lipídeos insaturados das membranas, resultando na formação de hidro ou lipoperóxidos, que são altamente reativos e podem dar início a uma cascata oxidativa, com severos danos a integridade da membrana. Nessa reação ocorre à liberação de produtos de degradação de ácidos graxos, como o malondialdeído (MDA). A oxidação dos ácidos graxos insaturados leva à sua quebra, com consequente formação, dentre outros compostos, do malondialdeído (MDA), que pode ser determinado pelo método Substâncias Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico (TBARS), no qual se faz reagir o com o ácido tiobarbitúrico para formar um pigmento rosado, que apresenta um máximo de absorção a 532-535nm (SÁNCHEZ-MORENO, 2002) e a quantificação deste composto têm sido utilizado para avaliar a extensão do dano oxidativo (OHKAWA et al, 1979).

O MDA possui ação citotóxica e genotóxica, encontrando em níveis elevados em algumas patologias associadas ao estresse oxidativo (VASCONCELOS et al., 2007; ANTUNES et al., 2008). O dano oxidativo a lipídeos é um processo complexo que envolve a interação de Espécies Reativas de Oxigênio com ácidos graxos poliinsaturados, componentes das membranas

celulares. Este processo resulta em desorganização estrutural e consequente perda da seletividade das membranas, podendo levar à morte celular (GUTTERIDGE; HALLIWELL, 2000; TSANG; CHUNG, 2009).

2.9.3 Proteínas Carboniladas

A reação direta da proteína com EROs pode conduzir a formação de derivados de proteínas ou fragmentos de peptídeos possuindo grupos carbonil altamente reativos, a carbonilação é uma modificação irreversível e não enzimática de proteínas (STADTMAN; LEVINE, 2006)

As proteínas são alvos imediatos para a modificação oxidativa ocasionada por ERO, alterando sua estrutura e provocando perda de função e fragmentação das estruturas protéicas. A formação da proteína carbonil parece ser um fenômeno comum durante a oxidação, e sua quantificação pode se usada para medir a extensão do dano oxidativo (BERLETT; STADMAN, 1997; BEAL, 2003; DALLE-DONNE et al., 2003). Os grupamentos carbonílicos (CO) são produzidos pela oxidação da cadeia lateral de aminoácidos suscetíveis, como prolina, arginina, lisina e treonina, ou pela clivagem oxidativa das proteínas. Também, os grupos carbonílicos podem ser introduzidos nas proteínas por uma reação secundária das cadeias laterais com aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica, como o malondialdeído (BERLETT; STADMAN, 1997; BEAL, 2003; DALLE – DONNE et al., 2003).

O conteúdo de proteína carbonil é atualmente o marcador de oxidação protéica mais usado e observa-se seu aumento em várias doenças humanas, tais como Doença de Alzheimer, *Diabetes mellitus*, processos inflamatórios e artrite reumatóide. Os níveis elevados de proteína carbonil também são indicadores de doenças derivadas do metabolismo protéico, e não somente de estresse oxidativo (DALLEDONNE et al., 2003). As proteínas modificadas oxidativamente são produtos quimicamente estáveis, sendo um fator importante para a sua detecção e armazenamento (RUTKOWSKA et al., 2005).

Alterações oxidativas de proteínas por espécies reativas afetam principalmente as cadeias laterais de aminoácidos e a detecção e quantificação dos grupos carbonil é baseada na formação

de hidrazonas após derivatização com 2,4- dinitrofenilhidrazina (DNPH) (STADTMAN; LEVINE, 2000).

2.10 Antioxidantes

O interesse em avaliar a capacidade antioxidante é resultado de vários estudos sobre a importância dos antioxidantes em sistemas biológicos (KARADAG et al., 2009). Os antioxidantes tem a capacidade de proteger um organismo dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo ou adiando o início de várias doenças, como cardiovasculares, crônicas (câncer, aterosclerose, artrite reumática, hipertrofia muscular) e neurodegenerativas (Mal de Alzheimer) (TINKEL et al., 2012; ALAM et al., 2013). Há um crescente interesse de pesquisadores no desenvolvimento de substâncias antioxidantes, principalmente a partir de produtos naturais como plantas.

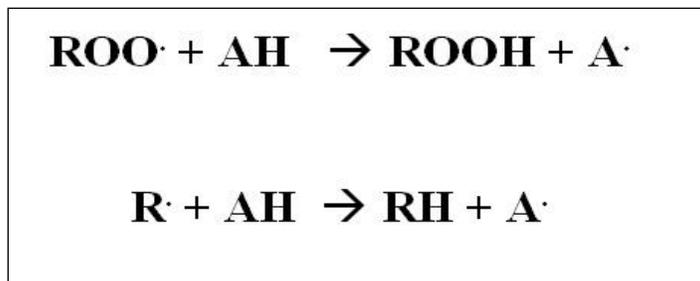
Os antioxidantes são substâncias eliminam os radicais livres reduzindo o nível de estresse oxidativo, inibindo e reduzindo as lesões causadas nas células, e conseqüentemente prevenindo as inúmeras doenças relacionadas ao estresse oxidativo (WU; HANSEN, 2008). Para que uma substância seja considerada antioxidante, ela deve estar presente em baixa concentração com relação quando comparada a do extrato oxidável, atrasando ou inibindo a oxidação deste substrato de maneira eficaz. Estas substâncias podem ter origem endógena, que são as enzimas como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase, ou origem exógena, que são as vitaminas, polifenóis e minerais (SIES; STAHL, 1995).

Bailey (1996) classificou os antioxidantes em primários, sinergistas, removedores de oxigênio, biológicos, agentes quelantes e antioxidantes mistos. Os antioxidantes primários são compostos fenólicos que promovem a remoção ou inativação dos radicais livres formados durante a iniciação ou propagação da reação, através da doação de átomos de hidrogênio a estas molécula, interrompendo a reação em cadeia (SIMI; JANOVIC, 1994).

O átomo de hidrogênio ativo do antioxidante é captado pelos radicais livres $R\cdot$ e $ROO\cdot$ formando-se espécies inativas para a reação em cadeia e um radical inerte (A.) procedente do

antioxidante (Figura 2). Este radical estabilizado por ressonância, não tem a capacidade de iniciar ou propagar as reações oxidativas (FRANKEL, 1980).

Figura 2- Mecanismo de ação dos antioxidantes primários. Legenda. ROO e R radicais livres; AH- antioxidante com um átomo de hidrogênio ativo e A' radical inerte.



O reparo das lesões antioxidantes causadas pelos radicais livres também é um mecanismo antioxidante, removendo danos das moléculas de DNA e reconstruindo as membranas celulares. Em outras situações há a adaptação do organismo, com o aumento das enzimas antioxidantes (BIANCCHI, ANTUNES, 1999).

Os antioxidantes sintéticos, usados na conservação de alimentos, produtos farmacêuticos e cosméticos apresentam efeitos secundários que podem causar danos no fígado, além de serem suspeitos de causarem mutagenicidade e neurotoxicidade (PIETTA, 2000; SORG, 2004; GOKTURK et al., 2007).

Os extratos de plantas e seus metabólitos derivados estão sendo alvos de estudos, pois podem proporcionar antioxidantes naturais e baixo custo que podem substituir antioxidantes sintéticos (KEYVAN DASTAMALCHI et al., 2008). Dentre as diversas classes de metabólitos secundários que apresentam atividade antioxidante, os compostos fenólicos atuam na inibição da peroxidação lipídica (SOARES, 2001). A atividade antioxidante dos fenóis se deve principalmente a sua estrutura química. Eles desenvolvem uma atividade redutora devido as suas hidroxilas que doam elétrons aos radicais livres, neutralizando ou sequestrando-os e ainda na quelatação de metais de transição. Os intermediários formados nestes processos são relativamente estáveis, devido à ressonância do anel aromático presente na estrutura destas substâncias

(SOARES, 2001; CHUM, 2005). Nos flavonoides a atividade antioxidante é ainda mais expressiva devido às hidroxilas em C₄ e C₃ do anel B, tendo o restante da estrutura base uma pequena influência (URSO; CLARKSON, 2003).

2.11 Toxicidade das plantas

Produtos naturais, utilizados na medicina tradicional, como alternativa aos fármacos convencionais estão cada vez mais populares e, não obstante a incerteza quanto à eficácia, muitos produtos naturais expõem os consumidores a vários efeitos adversos, uma vez que carecem de estudos científicos sobre suas propriedades farmacológicas e perfil toxicológico (CALIXTO, 2000; ROSSATO, 2009). Muitas plantas podem possuir propriedades farmacológicas e, simultaneamente, causar efeitos tóxicos, como danos ao DNA (MARQUES et al., 2003). Este conhecimento contradiz a falsa ideia de que drogas naturais, preparadas por produtos derivados de plantas, são seguras e isentas de efeitos adversos (CALIXTO, 2000).

Do ponto de vista toxicológico, deve-se considerar que produtos naturais não apresentam apenas efeitos imediatos, muitos se manifestam a longo prazo, até mesmo de forma assintomática, tais como os carcinogênicos, hepatotóxicos e nefrotóxicos (LAPA et al., 2007). Além do mais, podem apresentar potencial mutagênico e citotóxico (FREITAS, 2007). Todavia, fazem-se necessários estudos que investiguem estes efeitos para a segurança do seu uso pela população. Neste sentido, testes que avaliam a genotoxicidade como o ensaio cometa e mutagenicidade como o teste do micronúcleo são de fundamental importância no que se refere ao estabelecimento de risco para o ser humano (AQUINO, 2010).

A avaliação deste potencial, genotóxico/mutagênico, é recomendada por órgãos reguladores nacionais e internacionais para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos, já que estes testes são capazes de detectarem compostos que induzem danos genéticos direta ou indiretamente por diversos mecanismos (RIBEIRO, 2003; AQUINO, 2010).

2.12 Genotoxicidade

A genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos que alteram a base da vida, em sua estrutura físico-química, o DNA, processo classificado como mutagênese. Os agentes que mudam a seqüência do DNA são tóxicos para o gene e são, então, chamados de genotóxicos. A palavra mutação pode ser definida como sendo qualquer alteração permanente no DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica (SILVA et al. 2003). O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies, mas podem ocorrer uma série de problemas, podendo apresentar na maioria das vezes resultados maléficos, incluindo malformação, câncer, envelhecimento e morte. A probabilidade de uma mutação ser vantajosa pode ser difícil, mas existe (SILVA et al., 2003).

Nas últimas décadas o teste cometa passou a ser muito utilizado, sendo que o princípio desta técnica é a migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas. Quando observadas em microscópio, as células têm a aparência de um cometa, com cabeça (a região nuclear) e uma cauda contendo os fragmentos de DNA que migraram em direção ao pólo positivo (HARTMANN et al., 2003). O grau da lesão no DNA é verificado através de microscopia óptica, onde cem células são criteriosamente analisadas e classificadas em diferentes graus de lesão que variam de zero (células sem alteração morfológica) até quatro (DNA totalmente fragmentado) (HARTMANN et al., 2003; SILVA et al., 2003). Lesões no DNA que podem ser observadas através do teste cometa, não são somente quebras de fita, as quais têm um papel relevante na formação de aberrações cromossômicas, mas também modificações nas bases do DNA, como sítios apurínicos e apirimidínicos, que são relevantes na indução de mutações. Nestes casos, os agentes genotóxicos não induzem quebras diretamente, mas atuam gerando tais sítios no DNA. Esses sítios são álcali-lábeis e provavelmente são convertidos em quebras em altos pH, como o utilizado no teste cometa alcalino. Contudo, essas lesões primárias são passíveis de reparo e podem não resultar em alterações genéticas (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005).

O teste cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões gênicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferentes das mutações, as lesões detectadas

pelo teste cometa são passíveis de correção, sendo assim, o teste necessita de controles muito bem estabelecidos por ser muito sensível, o tempo entre a exposição e a análise deve ser o mais curto possível, pois o dano pode ser reparado, por isto o tempo curto de detecção. Assim sendo, o teste cometa pode ser utilizado também para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possa inferir a fidedignidade do processo de reparo (ALBERTINI et al., 2000).

2.12.1 Proliferação celular

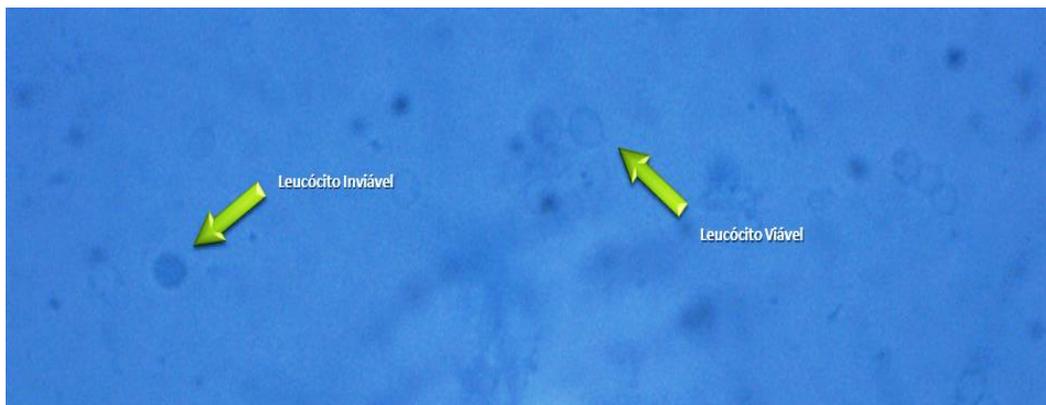
Uma nova célula surge no momento em que outra se divide, este fenômeno é conhecido como proliferação celular. O ciclo celular de uma célula eucariótica é dividido em duas etapas: intérfase, período em que a célula sintetiza novas proteínas e duplica seu DNA e fase M (mitose) período em que ocorre a divisão celular. Este processo é responsável pela reprodução de todos os organismos. A desregulação deste processo como erros durante a transcrição e síntese do DNA ou a desregulação do ciclo celular pode gerar uma produção demasiada e descontrolada de células formando tumores (ALBERTS et al., 2004). Para determinar o efeito de um extrato sobre a proliferação celular é contado o número de leucócitos em câmara de Neubauer.

2.12.2 Viabilidade celular

Entre os métodos que avaliam a viabilidade celular utiliza-se o corante azul de Tripán. Este tem a capacidade de penetrar somente em células mortas, que tem suas membranas danificadas, por meio do fluxo de corante que ocorre para o interior da célula, fornecendo uma coloração azul. Quando a integridade da membrana das células está comprometida, há absorção do corante para as células, que apresentam cor azul escura sem anel refringente em torno, já as células viáveis não são coradas, apresentando um aspecto transparente com um anel refringente em torno delas. Assim, células vivas não permitem a passagem do corante e, logo, não adquirem nenhuma coloração (ALVES et al., 2010). O teste de exclusão com azul de tripán é um método

rápido, simples e pouco dispendioso para avaliar a viabilidade celular em resposta a agressões ambientais (LOUIS; SIEGEL, 2011).

Figura 3- Avaliação da viabilidade celular de leucócitos medido pelo corante azul de Tripan.



2.12.3 Frequência de Micronúcleos

O teste do micronúcleo é um teste rápido e simples que detecta perdas e quebras cromossômicas, sendo, desta forma, indicado para avaliar efeito mutagênico (RIBEIRO, 2003). Este teste tem sido utilizado como ferramenta fundamental para a verificação de atividade mutagênica de muitos extratos vegetais (FIGUEIREDO, 2012).

Os micronúcleos são cromossomos inteiros ou fragmentos cromossômicos que não foram incorporados no núcleo da célula filha durante a divisão celular, em decorrência de danos induzidos nas células parenterais. Aparecem no citoplasma como um fragmento redondo ou oval como um pequeno micronúcleo contendo DNA, no entanto, sem qualquer relação com o núcleo principal, mas que indica fortes evidências de genotoxicidade, ou seja, capacidade do agente testado de induzir danos cromossômicos estruturais e/ou numéricos, os quais estão associados com o surgimento e/ou progressão de tumores e com efeitos reprodutivos adversos (RIBEIRO, 2003; JACOBOWSKI, 2009). Micronúcleo é um núcleo adicional e separado do núcleo principal de uma célula, sua formação se deve a alterações estruturais cromossômicas espontâneas ou

decorrentes de fatores ambientais ou, ainda, a falhas no fuso mitótico, sendo, portanto, excluído do novo núcleo formado na telófase (CARRARD et al., 2007; CHEQUER, 2008).

O teste do micronúcleo difere do ensaio cometa no tipo de alteração detectada no DNA. O primeiro detecta lesões irreparáveis, enquanto o segundo detecta lesões primárias, que são passíveis de correção (VALENTIN-SEVERIN, et al., 2003).

Os micronúcleos (MN) são pequenos corpúsculos similares em estrutura ao núcleo (Figura 4), formados por parte de cromossomos inteiros que foram perdidos na mitose, decorrente de quebras ou problemas de fuso, respectivamente. Tem sido demonstrado que, quando a membrana nuclear é refeita, o DNA serve de catalizador para se formar um completo envelope nuclear em torno dele. Por esta característica, qualquer fragmento ou cromossomos inteiros separados do núcleo principal, formam um pequeno núcleo, que é denominado de micronúcleo. Os micronúcleos são massas de cromatina originada de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros, que se perdem durante a anáfase na divisão celular, devido aos eventos clastogênicos ou aneugênicos, também podem ser formados pela interação de agentes químicos, físicos e biológicos com estruturas não genômicas, que promovem distúrbios na maquinaria mitótica e falha na segregação dos cromossomos. A ação dos agentes pode originar os micronúcleos, um ou vários por célula, que resultam em fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em migração para os pólos da célula durante a anáfase (FENECH, 2000; SOUZA; FONTANELLI, 2006).

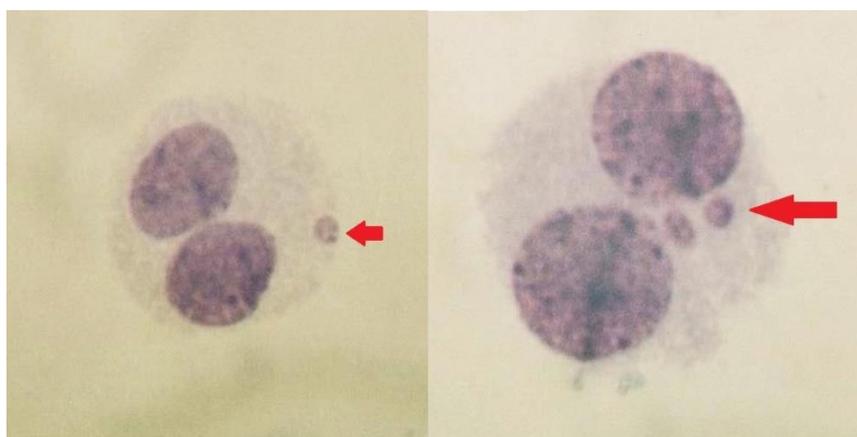
O teste do micronúcleo é um método amplamente utilizado para o monitoramento de danos genotóxicos em populações expostas às substâncias mutagênicas e carcinogênicas. A frequência de MN observada em um determinado momento pode ser considerada uma resposta complexa entre a atividade genotóxica e a eficiência do mecanismo fisiológico de defesa do organismo teste (MERSCH et al., 1996).

Para ser caracterizados como MN as alterações celulares devem preencher os seguintes critérios:

- Estrutura da cromatina similar e intensidade de cor semelhante ou mais fraca do que a do núcleo principal;

- Borda evidente, sugerindo membrana nuclear;
- Formato arredondado;
- Localização intracitoplasmática;
- Diâmetro menor do que 1/5 do núcleo principal (CARRARD et al., 2007).

Figura 4- Avaliação da frequência de Micronúcleos



2.12.4 Dano ao DNA

O ensaio cometa é um método bastante simples, sensível, rápido e de baixo custo para detecção de quebras nas fitas de DNA e estudos de reparo do DNA. O princípio do método proposto por Östling e Johanson (1984), é que o DNA sendo organizado em grandes estruturas enoveladas quando separadas por quebras na dupla-fita de DNA, migram para o ânodo através da eletroforese. O termo cometa refere-se justamente a este procedimento, que envolve a aplicação de corrente elétrica nas células e resulta no transporte de fragmentos de DNA para fora dos núcleos, lembrando um cometa com uma cabeça e cauda. Resumindo, a técnica do cometa permite avaliar os danos no DNA de células individuais causados pela substância teste (TICE, et al., 2000; AQUINO, 2010).

O Ensaio Cometa é uma técnica sensível, que avalia danos ao DNA de células individuais. Qualquer tipo celular pode ser avaliado, bastando que haja presença de núcleo, e uma característica importante do ensaio é a de precisar de apenas uma pequena quantidade de células. Este ensaio é de fácil execução, custo relativamente baixo, com boa reprodutibilidade, rapidez e sensibilidade, além de não depender da proliferação celular (FERRARO, 2009; PAOLO, 2006).

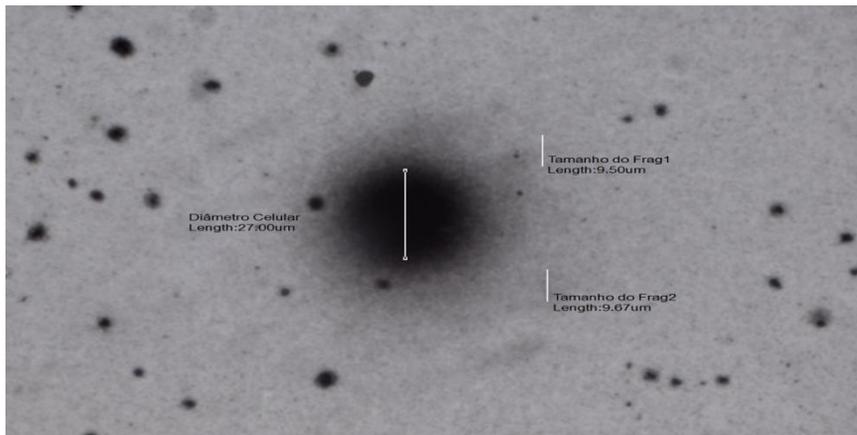
O Ensaio Cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Ele combina a simplicidade da técnica bioquímica de detecção de quebras no DNA com a utilização de poucas células e corresponde a um ensaio citogenético. As vantagens dessa técnica incluem a sensibilidade na detecção de dano no DNA; a coleta de dados em nível de célula individual; o uso de um número pequeno de células para a análise e a possibilidade de aplicação em qualquer população de células eucarióticas; e principalmente a rapidez de resultados (TICE, 2000).

O estresse oxidativo continuado predispõe a mutações no DNA, quando não reparadas podem desencadear os eventos iniciais que levam a formação das células cancerosas. A principal EROs indutora de mutações no DNA é o radical hidroxil que geralmente é formado a partir do excesso de moléculas de peróxido de hidrogênio disponíveis no citoplasma. O peróxido de hidrogênio em excesso tende a reagir com íons metais (Reação de Fenton), principalmente ferro e cobre produzindo o radical hidroxil que tem alta afinidade pelo DNA (BERRA et al., 2006).

O Ensaio Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o Ensaio Cometa pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (ALBERTINI et al., 2000).

A técnica do Ensaio Cometa consiste em obter, a partir de células individualizadas, colocadas em agarose, lisadas, submetidas à eletroforese e coradas, uma matriz com um halo fluorescente, formado por DNA não danificado e que não migrou. Células com DNA danificado formam um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado). A extensão do DNA que migrou está correlacionado com o dano ocorrido (TICE et al., 2000).

Figura 5- Análise da medida do Dano de DNA



2.13 Citotoxicidade

O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade é a viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais como o vermelho neutro, solúvel em água e que passa através da membrana celular, concentrando-se nos lisossomos, fixando-se por ligações eletrostáticas hidrofóbicas em sítios aniônicos na matriz lisossomal (ROGERO et al., 2000).

Muitas substâncias danificam as membranas resultando no decréscimo de captura e ligação do vermelho neutro. Portanto é possível distinguir entre células vivas (coloração rosadas) e danificadas ou mortas (transparentes), pela medida de intensidade de cor da cultura celular (CIAPETTI, 1996). O ensaio da citotoxicidade é considerado eficaz, de baixo custo, reprodutível e quantitativo, realizado pela medida de morte celular, sendo o IC_{50} (índice de citotoxicidade) a concentração do extrato que lesa ou mata 50% da população celular (DAGUANO et al., 2007).

Através da cultura de células é possível o desenvolvimento de diversas linhagens celulares oriundas de tumores humanos, possibilitando o desenvolvimento de metodologias para triagens *in vitro*. O Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos desenvolveu um painel de células cancerígenas com cerca de 60 linhagens oriundas de tumores sólidos e do sistema hematopoiético, permitindo a avaliação em diversos tipos de células neoplásicas, possibilitando a

descoberta de drogas com maior especificidade, além de ser rápida e eficaz. A metodologia *in vitro* para avaliação de espécies vegetais tem permitido a análise de centenas de extratos, princípios ativos e substâncias obtidas por síntese (RUBINSTEIN et al., 1990).

Pesquisas indicam que mais de 1000 espécies de plantas apresentam atividades antitumorais significantes. Esses produtos de origem vegetal apresentam uma grande variedade de classes de compostos e estruturas que incluem alcaloides, flavonoides, terpenos, entre outros (FERRAZ et al., 2005). Dentre os fármacos anticancerígenos derivados de plantas utilizados clinicamente tem-se os alcaloides vincristina e vimblastina, isolados da *Catharanthus roseus*, que são utilizados para o tratamento de linfomas e leucemia infantil (CRAGG; NEWMAN, 2007). O diterpeno taxol ou paclitaxel (Taxol ®) é extraído das cascas do pinheiro *Taxus brevifolia* e das folhas de várias espécies de *Taxus* e é empregado terapeuticamente para o tratamento de câncer ovariano, mamário e pulmonar (GANESAN, 2008; MESQUITA, 2009). A partir da camptotecina, isolada da árvore *Camptotheca acuminata* Decne, derivaram uma classe de agentes clinicamente ativos utilizados no tratamento de câncer de ovário e cervical (BUTLER, 2004).

A escolha das células para a realização dos testes de citotoxicidade deve-se priorizar células com maior sensibilidade. Os ensaios podem ser realizados utilizando linhagens celulares de fácil manuseio, com características estáveis e resultados reproduzíveis (CRUZ, 2003) como células de Ovário de Hamster Chinês (CHO) e linhagens NCTC clone 929.

BRAZILIAN JOURNAL OF PHARMACEUTICAL SCIENCES**RECIBO****Nº de Registro: 178/15**

Acusamos o recebimento do trabalho para publicação no **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**.

Autoria: Raquel Medina Martins Necchi, Carine Viana, Gabriel Reis, Melânia Palermo Manfron

Título Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, and iron in *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dick (Cactaceae) with atomic absorption spectrometry

São Paulo, 21 de Setembro de 2015

Profa. Elizabeth Igne Ferreira
Editoria Científica

**Determination of sodium, potassium, calcium, magnesium, zinc, and iron in
Nopalea cochenillifera (L.) Salm Dick (Cactaceae) with atomic absorption spectrometry**

Raquel Medina Martins Necchi^{1*}, Carine Viana¹, Gabriel Reis¹, Melânia PalermoManfron¹

¹Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal de Santa Maria,
Prédio 26, Santa Maria, RS, CEP: 97105-900, Brasil.

*Correspondece: R.M.M, Necchi, Laboratório de Farmacognosia, ranecchi@hotmail.com-
Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria- R.S, CEP: 97105-900, Brasil

ABSTRACT

Nopalea cochenillifera is a plant of the Cactaceae family widely used for both food and feed, and in traditional medicine for its hypoglycemic, anti-inflammatory, analgesic, and antimicrobial activities. Given the importance of its uses and the absence of data concerning its inorganic composition, this study proposes to determine the occurrence of mineral nutrients in its cladodes using atomic absorption spectrometry. The results revealed that *Nopalea cochenillifera* contains significant amounts of calcium (6271.0 mg/100g), potassium (3849.0 mg/100 g), magnesium (2998.0 mg/100g), zinc (14.7mg/100g), and iron (7.29 mg/100g), and low sodium content (5.0 mg/100g). Considering the Recommended Daily Intake amounts needed for a healthy adult, *N. cochenillifera* might well make some contribution. The plant (dried and ground) has a great concentration of these compounds which are preservable for extended periods. This cactus is a good economic alternative as a nutritional supplement, having excellent cultivar adaptation in various types of soil and climatic conditions.

Uniterms: *Nopalea cochenillifera*, Mineral, Flame Atomic Absorption Spectrometry, medicinal plant, Cactaceae.

RESUMO

Nopalea cochenillifera é uma planta da família Cactaceae amplamente utilizada na alimentação humana e animal, assim como na medicina tradicional como hipoglicemiante, anti-inflamatória, analgésica e antimicrobiana. Diante da importância dos seus usos e da ausência de dados acerca da sua composição inorgânica, o presente trabalho propõe determinar a ocorrência de nutrientes minerais nos seus cladódios através da espectrometria de absorção atômica. Os resultados demonstraram que apresenta teor significativo de cálcio (6271,0 mg/100g), potássio (3849,0 mg/100g), magnésio (2998,0 mg/100g), zinco (14,7mg/100g), ferro (7,29 mg/100g) e um baixo conteúdo de sódio (5mg/100g). *N. cochenillifera* pode contribuir para os aportes de Ingestão Diária Recomendada considerando os valores necessários para um adulto saudável. A utilização desta plantas seca e moída possui uma concentração maior dos compostos além da vantagem de melhor conservação por períodos prolongados. Esta cactácea é uma boa alternativa econômica para a utilização como suplemento nutricional, pois apresenta excelente adaptação de cultivo em vários tipos de solos e condições climáticas.

Unitermos: *Nopalea cochenillifera*, Mineral, Espectrometria Absorção Atômica de Chama, planta medicinal, Cactaceae.

INTRODUCTION

Nopalea cochenillifera (figure 1) is a shrub belonging to the family of Cactaceae, originating in Mexico. It is popularly known (in Brazil) as the ‘petite palm’, ‘cactus palm’ and ‘sweet palm’ (Lorenzi and Souza, 2005; Terrazas and Mauseth, 2002). The Cactaceae family is divided into three tribes: *Pereskieae*, *Opuntieae*, *Cereae*, tribes which make up a number of genres. Of the various species introduced to Brazil, two have had greater adaptation: the petite palm (*Nopalea cochenillifera*), and the large or round cactus palm (*Opuntia sp.*) (Barroso et al., 2002; Maia Neto, 2000).

The use of plants in foods with nutritive and therapeutic purposes has been increasing over time (Smith et al., 2010). Determination of mineral contents in edible plants is essential to secure proper applications in nutrition (Fernandez et al., 2002; Almeida et al., 2002). The use of palms in foods occurs mainly in Mexico (and other countries with Mexican influence) with reports of

more than 200 cactus recipes (Flores 2001; Guedes 2004). In the US and certain countries in Europe and Asia, recipes are consumed sporadically as an exotic food. In Brazil, in some municipalities of Bahia's backlands and in the Chapada Diamantina, the palm is also included as a basic food (Guedes, 2002). Besides being used as food, in periods of drought, its cladodes are reported as being consumed as forage by cattle, sheep, and goats in Brazil, Chile, California, Morocco, Mexico, South Africa, Texas, and Tunisia (Felker et al., 1997).

Palms are commonly eaten fresh or cooked, and present in their constitution 92% water, 4-6% carbohydrate, 1% protein, 0.2% fat, 1% minerals, vitamin C (12.7 mg/100g), and β -carotene (12.9 μ g/100g) (Stintzing et al., 2001; Saenz et al., 2006). However, there are few studies regarding their chemical and mineral compositions. In *N. cochenillifera* cladodes we find flavonoids, saponins, tannins, and anthraquinones (Gomez-Flores et al., 2006; Necchi et al., 2012).

As to its pharmacological activities, Necchi et al., (2011) demonstrated that the plant *N. cochenillifera* possesses significant anti-inflammatory activity (using the granuloma induction method), when compared to nimesulide. In addition, *N. cochenillifera* showed significant *in vitro* antimicrobial activity against *Escherichia coli*, *Salmonella enterica*, and *Candida albicans* (Gomez-Flores 2006; Necchi et al., 2012).

This study determined the content of Ca, Mg, K, Na, Fe, and Zn in *N. cochenillifera*. The concentrations were determined by atomic absorption spectrometry and a discussion in terms of daily intake references, and maximum permitted intake is pursued.



FIGURE 1. *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm Dick (Cactaceae)

MATERIALS AND METHODS

Plant material

Dry *N. cochenillifera* cladodes were collected in March 2013, in Santa Maria, RS. The material was recorded in the Herbarium of the Department of Botany CCNE of the Federal University of Santa Maria (UFSM). The plant was dried in an air circulating oven at 40° C for 72 hours, and was then ground in a Wiley mill. Authorization for use of the Brazilian genetic patrimony was issued by CNPq (process number 010529/2014-4).

Instrumentation/procedure

All measurements were carried out using an ANALYTIK Jena AG (Jena, Germany) model novAA 300 atomic absorption spectrometer equipped with SpectrAA (Varian, Australia) hollow cathode lamps as the radiation source. An acetylene-air or acetylene-nitrous oxide flame was used; the gas flow rates and the burner height were adjusted to obtain the maximum absorbance signal for each element. Other instrumental parameters were set to the values shown in Table 1.

Table I - Instrumental parameters for metal determination in *Nopalea cochenillifera*

Metal	Wavelength (nm)	Slit width (nm)	I (mA)	Integration time (s)	Flame
Na	589.0	0.8	3.0	3.0	C ₂ H ₂ – air
K	766.5	0.8	4.0	3.0	C ₂ H ₂ – air
Ca	422.7	1.2	4.0	3.0	N ₂ O – C ₂ H ₂
Mg	285.2	1.2	2.0	3.0	C ₂ H ₂ – air
Zn	213.9	0.5	6.0	3.0	C ₂ H ₂ – air
Fe	248.3	0.2	8.0	3.0	N ₂ O – C ₂ H ₂

Reagents

All reagents were of analytical grade, and the distilled and deionized water was further purified by a Milli-Q high purity water device (electrical resistivity of 18.0 M Ω cm) (Millipore, USA). Laboratory glassware was kept overnight in 10% (v/v) HNO₃ in ethanol solution, and shortly before use was washed with water and dried in a dust free environment. The concentrated nitric acid used in this study was supplied by Merck (Germany). Na, K, Ca, Mg, Zn, and Fe standard solutions (1000 mg L⁻¹) were obtained from the National Institute of Standards and Technology (NIST, USA), and diluted as necessary to obtain working standards. The certified reference material (CRM) RM 8415 Whole Egg Powder (NIST) was used to check the accuracy of the proposed method.

Sample preparation

For digestion of the plants and the obtaining the mineral forms of Ca, Mg, K, Na, Fe, and Zn, 0.50 g of sample was dissolved in 6 mL of HNO₃, 2 mL of H₂O₂, and 2 mL of HCl and heated in a block digester at approximately 100 °C, as described in EPA 3050B with some modifications. The mixture was then brought to a volume of 50 mL with ultrapure water. A blank digest was carried out the same way for both procedures. The analytical parameters are shown in Table 1.

RESULTS AND DISCUSSION

Method validation

The characteristics of an analytical method are defined by the figures of merit, which should be determined experimentally. The proposed method was validated for six metals (Na, K, Ca, Mg, Zn, and Fe). The figures of merit presented were analytical curve linearity, accuracy, and precision. In addition, sensitivity was determined by characteristic concentration (C₀). In this study, calibration with aqueous standards was possible and the linearity ranges were selected to span the metal concentrations expected in real samples. Analytical curves were constructed by evaluating the relation between response (peak height and absorbance) and concentration by

linear regression analysis yielding the results shown in Table 2.

Table II- Regression parameters of the metal analytical curves.

Metal	Range (mg L ⁻¹)	Regression equation ^a	R ²	c ₀ (mg L ⁻¹)	LOD (mg L ⁻¹)
Na	0.5 – 5	y=0.022501+0.133348x	0.9876	0.015	0.02
K	2 – 10	y=0.04326+0.129430x	0.9881	0.024	0.05
Ca	0.5 – 8	y=0.002305+0.036897x	0.9940	0.044	0.16
Mg	0.5 - 4	y=0.082474+0.207855x	0.9518	0.019	0.03
Zn	0.5 – 5	y=0.037483+0.154119x	0.9776	0.018	0.02
Fe	0.5 – 10	y=0.000539+0.01773x	0.9983	0.191	0.02

^aAbsorbance; c₀= characteristic concentration; LOD = Limit of detection

In all instances, a linear fit was found to be adequate for the purpose. Table 2 also presents the values found for characteristic concentration for each element. The accuracy of the method was further confirmed using a certified reference material (egg powder, NIST RM 8415). The results are shown in Table 3. Statistical comparison by means of the *t*-test showed that there was no significant difference between the values obtained using the proposed method and the certified values. The precision of the procedures was determined through repeatability (intra-day precision). Six samples were assayed during the same day, under the same experimental conditions. Intermediate precision (inter-day) was evaluated by assaying samples on three different days (n=3). The repeatability presented good relative standard deviation (RSD) values for all of the metals. The intermediate precision was evaluated using both the RSD and *F*-test. The computed *F*-values were lower than tabulated *F*-values, indicating no significant difference between the results obtained on different days. All data regarding precision are shown in Table 3.

Table III - Method precision for the selected mineral and accuracy evaluated using a certified reference material (egg powder, NIST RM 8415)

Mineral	Concentrations $\mu\text{g g}^{-1}$		Recovery (%)	Precision	
	Certified value	Found		Intra day (RSD)	Inter day (RSD/ $F_{\text{exp}}^{\text{a}}$)
Na	3770 \pm 34	3785 \pm 34.6	100.4	0.6	0.8 / 2.25
K	3190 \pm 37	3165 \pm 26.1	99.2	1.9	1.3/3.27
Ca	2480 \pm 19	2497 \pm 18.2	100.7	0.7	2.5/3.87
Mg	305 \pm 27	310.0 \pm 9.0	101.6	1.3	1.2 / 3.45
Zn	67.5 \pm 8	66.0 \pm 2.9	97.8	1.2	2.3 / 3.87
Fe	112 \pm 16	107.9 \pm 4.3	96.3	1.6	4.3/3.10

Mean value (n=3) \pm standard deviation- $^{\text{a}}F_{\text{tab}} = 4.26$ (p 0.05) RSD= relative standard deviation

Metal determination in *Nopalea cochenillifera*

The Recommended Daily Intake (RDI), and the Adequate Intake (AI) are recommended intake levels for individuals as applied to the general healthy population. The RDI is the average daily intake, for almost all healthy individuals, of a nutrient needed to meet one's nutritional needs. The AI is the average recommended daily intake of a nutrient, considered adequate, but with values based on estimates. Both represent recommended levels of intake for individuals, and the RDI and AI are used as targets for individual intakes (IOM 1997; IOM 2000; IOM, 2004).

The mineral determinations for the cladodes of *Nopalea cochenillifera* by atomic absorption spectrometry are shown in Table 4. In order to elucidate how *Nopalea cochenillifera* might contribute to the RDI, ingestion for each nutrient was calculated considering the necessary values for a healthy male adult. Table 4 shows the amount of plant consumed (dry or fresh) and its contribution to the intake of the minerals analyzed.

Table IV- Dietary Reference Intake (DRI) or Adequate Intake (AI) to mineral and its concentrations in *Nopalea cochenillifera*. Quantity of plant necessary to consume 100% of DRI.

Mineral	DRI or AI (mg)	Concentrations (mg/100g \pm SD, n=6)	Dried plant (g)	Fresh plant (g)
K¹	4700	3849.0 \pm 21.2	122	1562
Na¹	1500	5.0 \pm 0.1	30.000	384.000
Ca¹	1000	6271.0 \pm 43.9	16	204
Mg²	400	2998.0 \pm 40.2	13	171
Zn²	11	14.7 \pm 0.2	75	957
Fe²	8	7.2 \pm 0.1	111	1421

¹AI: adequate intake; ²DRI: Dietary reference intake; values are taken from Institute of Medicine

Dessimoni et al., (2014) analyzed the mineral composition in the cladodes of a cactus from the same family (*Opuntia ficus indica*) and found the following concentrations: calcium 2836 mg/100g, Potassium 1135 mg/100g, magnesium 1024 mg/100g, Iron 9 mg/100 g, and Zinc 8.6 mg/100g. The cladodes of *Opuntia ficus* are used in food in the form of dried and ground flour,

and in the fresh form as a vegetable in salads and stews (Brazil, 2002). In this study, we found higher levels of potassium, calcium, magnesium, and zinc than those reported for *Opuntia ficus indica*.

Calcium plays a role in mediating vascular contraction, vasodilation, muscle contraction, nerve transmission and glandular secretion (IOM, 1997). Calcium has also been inversely associated with blood pressure, although with less intensity than potassium (Steinberg et al. 2003). *Nopalea cochenillifera*, in a portion of only 16g of dried plant represents 100% of the recommended daily intake for a healthy adult (IOM, 2004). This level of calcium is significant in comparison with other food sources, making cactus an excellent source of calcium in the diet.

Magnesium catalyzes many biological reactions, including protein synthesis, nerve impulse transmission, muscle relaxation, and energy production (Steinberg et al., 2003; Planells et al., 1997). *Nopalea cochenillifera* is also a good source of magnesium, since a portion of about 13g can provide 100% of the RDI (400 mg) for magnesium (IOM, 1997).

Potassium is essential for the maintenance of cellular osmolarity and membrane potentials and therefore plays a role in vascular tone and other biochemical pathways related to cardiovascular health. In addition, there is an inverse relationship between potassium intake and blood pressure. However, patients with renal failure having reduced elimination may suffer high potassium levels with consequent disruptions in muscle activity, which occurs mainly in the heart (Steinberg et al., 2003; IOM, 2004). The potassium content in a portion of 120 g of dried *Nopalea cochenillifera* equals 100% of the recommended daily intake to a healthy adult (IOM, 2004).

Potassium in association with sodium performs tasks in the conduction of nerve impulses, muscle contraction, and relaxation, in insulin secretion, and in retention of the acid/base equilibrium. Sodium is directly linked to these functions and potassium is an important factor in the regulation of human blood pressure (IOM, 2004). The appropriate amount of sodium intake is 1500 mg daily. In this study, in the cladodes of *Nopalea cochenillifera*, it was determined that the element sodium is present in low concentrations.

The minority components, iron and zinc, are essential to the body. Iron is necessary for homeostasis, and is essential for blood and muscle systems; and zinc functions as a component of various enzymes, in maintaining the structural integrity of proteins, and in regulation of gene expression, and immunological function (IOM, 2000). *Nopalea cochenillifera* may be a potential vehicle for supplementation of these metals. Portions of about 75 g and 110 g of dried plant provide 100% of the RDI for a healthy adult of zinc and iron respectively.

Table 4 also shows the amount of fresh plant that must be consumed to provide 100% of the RDI for each nutrient. The chemical composition of cladodes may vary with soil, the locale of cultivation, the season, and the age of the plant (Batista et al., 2003), however our study reveals previously unpublished data on the species.

CONCLUSION

The cladodes of *Nopalea cochenillifera* can be considered a good source of nutrients due to the considerable amounts of calcium, potassium, magnesium, zinc, and iron. It also enjoys low sodium content. Dried, ground plants have a higher potential for use as a nutritional supplement because of the higher concentrations of desired compounds, with the advantage of better preservation for extended periods. Cacti represent a good economical alternative because of their excellent adaptation to farming in various types of soils and climatic conditions.

REFERENCES

- ALMEIDA, M.M.B.; LOPES, M.F.G.; NOGUEIRA, C.M.D.;MAGALHÃES, C.E.C., MORAIS, N.M.T., Determinação de Nutrientes Minerais em Cinco Plantas Medicinais, **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, Campinas, 22(1): 94-97, jan.-abr. 2002.
- BATISTA, M.M.F.; VIÉGA, I.J.M.; FRAZÃO, D.A.C.; THOMAZ, M.A.A.; SILVA, R.C.L. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em graviroleiras (*Annona muricata*). **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 25, n. 2, 315-318, 2003.
- BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A. L.; ICHASO, C. L. F.; GUIMARÃES, E. F.; COSTA, C. G. **Sistemática de angiospermas do Brasil**. 2ª ed. Viçosa, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e fitoterápicos**/ Ministério da Saúde, Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).
- DESSIMONI, G.V ; BARBOSA CD, DESSIMIONI-PINTO NAV. Composição bromatológica, mineral e fatores antinutricionais da palma forrageira. **Tecnol. e Ciên. Agropec**, v.8, n3, p 51-55, 2004.
- FELKER, P.; SINGH, G.; PAREEK, O.P. Opportunities for development of cactus (*Opuntia spp.*) in arid and semi-arid regions. **Ann. Arid Zone** 36: 267–278, 1997.
- FERNANDEZ, P.L., PABLOS, F.,MARTÍN,M.J., GONZALEZ, A.G., Analytical Nutritional and Clinical Methods Section Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, **Food Chemistry** 76, 483–489, 2002.
- FLORES VALDEZ, C.A. **Produção, industrialização e comercialização de verdura de palma forrageira**. In: Barbera, Guiseppe; Inglese, Paolo (Eds.). *Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira*. Paraíba: SEBRAE/PB, 94-102, 2001.
- GOMES-FLORES, R.; TAMEZ-GUERRA, P.; TAMEZ-GUERRA, R.; RODRIGUEZ-PADILHA, C.; MONREAL-CUEVAS, E., HAUAD-MARROQUIM, L.A.; CORDOVA-

PUENTE, C.; RANGE-LLANAS, A. *In vitro* antibacterial and antifungal activities of *Nopalea cochenillifera* pad extracts. *American journal of infectious diseases* 2: 1-8, 2006

GUEDES, C.C. **Culinária com broto de palma**. João Pessoa: Universitária, 53p, 2002.

GUEDES, C.C. **Broto de palma – sabor e nutrição: livro de receitas**. Recife: SEBRAEPE / FAEPE, 48p, 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington (DC): National Academy Press; 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Academy of Sciences on Dietary Reference Intakes (DRIs) for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate, 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Academy of Sciences on DRIs for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Academy of Sciences on DRIs for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc., 2000.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes. Washington (DC): National Academy Press; 2005. URL: www.iom.edu. Accessed 24.07.15.

MAIA NETO, A.L. **Cultivo e utilização da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill. e *Nopalea cochenillifera* (Salm Dyck) para produção de leite no semi-árido nordestino**. Salvador: Universidade Federal da Bahia/Escola de Medicina Veterinária/ Departamento de Produção Animal, 40 p. (Monografia), 2000.

NECCHI, R.M.M; ZANETTI, G.D; MAKI, T.D.T; ROYER, L.A.J; MANFRON, M.P. Morphology and histochemistry of cladodes of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae). **Lat. Am. J. Pharm.** 29: 422-427, 2010.

NECCHI, R.M.M, MAKI, T.D.T, DO CANTO, G.S; MORESCO, R.N. DALMORA, S.L.; MANFRON, M.P. Antiinflammatory Activity and Biochemical Parameters of the Ethanol Extract of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae) **Lat. Am. J. Pharm.** 30 (4): 786-9, 2011.

NECCHI, R.M.M; ALVES, I.A, ALVES S.H.; MANFRON, M.P. *In vitro* antimicrobial activity, total polyphenols and flavonoids contents of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae) **Research in Pharmacy** 2(3): 01-07, 2012.

PLANELLS, E.; RIVERO, M.; CARBONELL, J.; MATAIX, J.; LLOPIS, J. Ability of a Cocoa Product to Prevent Chronic Mg Deficiency in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, 45: 4017–4022, 1997.

SÀENZ, C. Cladodes: a source of dietary fiber. J. Prof. Assoc. **Cactus Dev.**, 117–123, 1997.

SILVA, C.S.; NUNES, P.O.; MESCOUTO, C.S.T.; MULLER, R.C.S.; PALHETA, D.C.; FERNANDES, K.G. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia férrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, v. 30, n.3:751-754, 2010.

SOUZA C.V.; LORENZI H. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa, Instituto Plantarum. São Paulo, 2005.

STINTZING, F.C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. **Eur Food Res Technol** 212: 396-407, 2001.

STINTZING, F.C.; CARLE, R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. **Molecular Nutrition and Food Research** 49: 175-194. 2005.

STEINBERG, F.M.; BEARDEN, M.M.; KEEN, C.L. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. *Journal of the American Dietetic Association*. **Journal of the American Dietetic Association** 103: 215–23, 2003.

TERRAZAS, T.; MAUSETH, J.D. **Stem anatomy and morphology.** California University Press, Berkeley, 47-60, 2002.

Submission Confirmation - The Journal of Toxicological Sciences

(JTS-16133)

scied_j.toxicol.sci@senkyo.co.jp (scied_j.toxicol.sci@senkyo.co.jp)

23/06/2016

Para: ranecchi@hotmail.com

Dear Dr. Necchi,

We are pleased to have received your manuscript mentioned below. You will be able to check on the status of your manuscript by logging on to the Author Login.

The URL of Author Login is <https://www.e-kenkyu.com/jtoxicol-scied/>

Account ID: ranecchi@hotmail.com

Thank you for submitting your work to The Journal of Toxicological Sciences.

Sincerely yours,

Toshiyuki Kaji, Ph.D.

Editor-in-Chief

The Journal of Toxicological Sciences

Office of SciEd: scied_j.toxicol.sci@senkyo.co.jp

MS.No. : JTS-16133

Type of Manuscript : Original Article

Title : Genotoxicity and oxidative profile of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick (Cactaceae)

Authors : Raquel Medina Martins Necchi, Rafaela Dornelles, Luís Flavio Souza De Oliveira, Raul Oliveira De Souza, Michel Mansur Machado, Melânia Palermo Manfron

Corresponding Author: Raquel Medina Martins Necchi

Genotoxicity and oxidative profile of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick (Cactaceae)

Raquel Medina Martins Necchi^{1*}, Rafaela Dornelles¹, Luis Flavio Souza De Oliveira², Raul Oliveira de Souza ², Michel Mansur Machado², Melânia Palermo Manfron¹

¹ Federal University of Santa Maria, Department of Industrial Pharmacy, Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, , UFSM, Santa Maria - RS, Brazil.

² Federal University of Pampa, Department of Industrial Pharmacy. Graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Uruguaiana - RS, Brazil.

Original Articles

Genotoxicity and oxidative profile of *N. cochenillifera*

C1 General toxicity, C3 Genetic toxicity, C5 Behavioral toxicity, C10 Cytotoxicity, C11 Oxidative stress

*Corresponding author: Raquel Medina Martins Necchi
Federal University of Santa Maria, Santa Maria- R.S, Avenida Roraima, 1000, CEP: 97105-900, Brazil
Phone number: 55 55 99326057
Email: ranecchi@hotmail.com

ABSTRACT: *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck is a bushy cactus found in various regions of the world, known by names such as “palma-doce” and “palma miúda”, its cladodes are used in traditional medicine for their hypoglycemic, anti-inflammatory, analgesic, lipid-lowering, antimicrobial, and diuretic properties. This study aims to present a preliminary toxicological evaluation through analysis of oxidative parameters like total free radicals, lipid peroxidation and amount of protein carbonyls. It was performed genotoxicological assessments of the extract on human leukocyte cultures through viability and cell proliferation, micronucleus and DNA damage testing, and cytotoxicity of the extract against connective tissue of mouse-clone 929 (NCTC) and chinese hamster ovary cell cultures (CHO). It was observed that *Nopalea cochenillifera* acted as an antioxidant agent reducing and reversing the effects caused by hydrogen peroxide. The genotoxicological parameters assessed in peripheral blood cells don't showed mutagenic effects, DNA damage, or decreased cellular viability. For NCTC and CHO cells; *Nopalea cochenillifera* showed low cytotoxicity. In the absence of studies investigating the parameters tested, this work serves as a first step towards toxicological characterization of the species

Key words: antioxidant capacity, genotoxicity, oxidative damage, cell culture, *Nopalea cochenillifera*.

INTRODUCTION

Nopalea cochenillifera (figure 1) is a shrubby plant, occurs naturally from Mexico to Panama and are adapted in several countries (Hunt et al. 1990; Barbosa et al. 1996). This cactus is used in traditional medicine as antiinflammatory, analgesic, diuretic, and as a hypoglycemic agent (Park et al. 2001; Cetto et al. 2005). In vitro studies, *N. cochenillifera* showed strong antibacterial activity (Necchi et al. 2011). The cladodes of *N. cochenillifera* have the presence of flavonoids, saponins, tannins and anthraquinones (Gomes-Florez et al. 2006; Necchi et al. 2010; Necchi et al. 2012). The popular use of medicinal plants, through their various forms of preparation and use is widespread. This popularization, coupled with ease of access, gives rise to many problems, including lack of adequate information on their properties, the possibility of drug interactions in concomitant use with medicines and other plant species, problems in botanical identification, and ignorance concerning possible adverse effects (Macedo et al. 2007; Veiga Junior, 2008). The World Health Organization (WHO) reports that 82% of the world population uses some form of traditional medicine for their primary health care, such as plant extracts or their active principles (Morris et al. 2012). While natural products used in traditional medicine as an alternative to conventional drugs are becoming increasingly popular, the lack of scientific studies on their pharmacological properties and toxicological profiles brings uncertainties regarding their effectiveness and exposes consumers to various adverse effects (Calixto, 2000). Many plants that have pharmacological properties simultaneously cause toxic effects, such as DNA damage (Marques et al. 2003). This contradicts the misconception that natural drugs prepared with products derived from plants are safe and free from side effects (Calixto, 2000).

From a toxicological point of view, one should consider that many natural products present not only immediate effects, but manifest themselves asymptotically, and in the long run are carcinogenic, hepatotoxic, or nephrotoxic, and sometimes mutagenic and cytotoxic effects (Rehman et al. 2016). Studies investigating these effects and the safety of natural product use by the population have become necessary. In this regard, tests assessing genotoxicity such as the comet assay, and mutagenicity as the micronucleus assay test are of fundamental importance with regard to categorizing risks for humans (Tice et al. 2000; Fenech, 2000; Fenech et al. 2003; Speit and Hartmann 2005). Evaluation of genotoxic/mutagenic potential is recommended by national and international regulatory agencies to register new chemicals and pharmaceuticals. These tests are able to detect the compounds that directly or indirectly (by various mechanisms) induce genetic damage (Collins 2004; Speit and Hartmann 2005).

Studies investigating the efficacy and safety of popularly reported species provide the information needed to guarantee their appropriate use while also promoting discovery of new pharmacologically active compounds (Maciel et al. 2002). Brazil enjoys an immense biodiversity, and presents a long tradition of medicinal plant use. This combination establishes promising scenario for the development of research aimed at discovering new drugs from native species (Albuquerque et al. 2006). The selection of a plant species for study is often based on human anecdotal claims of therapeutic effect, which is a valuable shortcut to drug discovery. Traditional use can be pre-screened for therapeutic utility (Harvey, 2000). Among the many plant species of medicinal interest is the genus *Nopalea*, which has various uses in folk medicine. This study evaluates the oxidative profile and the toxicity of *Nopalea cochenillifera*.

MATERIALS E METHODS

Preparation of plant material

The plant material was cladodes of *Nopalea cochenillifera* collected and identified in the city of Santa Maria/RS, in 2013. The material was duly registered in the Herbarium of the Department of Botany of the CCNE UFSM as voucher specimen SMDB 11835. Fresh cladodes were subjected to extraction by cold maceration in 70% ethanol for 30 days and freeze-dried to obtain dry extract.

Preparation of Culture of Human Leukocyte

The white blood cell cultures were prepared using 0.5 mL of venous blood collected by voluntary venipuncture (research approved by the Ethics Committee of the Federal University of Santa Maria, Letter of approval N^o. 23081), and immediately transferred to the culture medium containing 10 mL RPMI 1640 supplemented with 10% fetal bovine serum and 1% streptomycin/penicillin (Santos Montagner et al. 2010). The cells were placed in an oven under 5% CO₂ and at 37 °C for 72 hours. For the oxidative profile and genotoxicological evaluation tests we used a negative control that received 1000 μM of pH 7.4 phosphate buffer, and a positive control containing hydrogen peroxide at 10μM. In all treatments, each group consisted of three bottles of culture.

To evaluate the antioxidant and anti-genotoxic state profiles, leucocyte cultures were divided into five groups. The groups were: negative control (phosphate buffer pH 7.2); a positive control (hydrogen peroxide 10μM); and three groups with different concentrations of the extract obtained from toxicity studies. The groups with *N. cochenillifera* also received 10μM H₂O₂ to induce oxidation.

Analysis of Oxidation Parameters

Lipid peroxidation

The oxidative parameters were assessed by lipid peroxidation, measuring the formation of Thiobarbituric Acid Reactive Species (TBARS) (Ohkawa et al. 1979). The method measured the color produced by TBA reaction with malondialdehyde (MDA), spectrophotometrically at 532 nm. Initially, *N. cochenillifera* stock solutions were prepared. To 200 μL of plasma were added 100 μL of 100 μM (1:10 dilution) hydrogen peroxide solution, and 200 μL of *N. cochenillifera* solution for test. For the positive control were employed 200 μL of hydrogen peroxide in place of the sample. In the negative control, sample was replaced with saline. It was transferred 200 μL from the contents of the first tube, 100μL of butylated hydroxytoluene (BHT), and 500μl 10mM Trichloroacetic Acid (TCA) 20% were added. The mixture was homogenized and centrifuged for 5 minutes at 2000 rpm. The resulting solution was used as the sample and transferred to a test tube. All tubes were brought by water bath to 95 °C for 1 hour. After cooling, absorbance was read by spectrophotometer at 532 nm. A malondialdehyde (MDA) calibration curve, varying from 0.6 to 9.6 nMol MDA/mL was previously prepared for the purposes of the calculation ($y = 0.1711x - 0.022/R^2 = 0.9991$).

Carbonyl Proteins

The amount of carbonyl protein was evaluated according Morabito et al. (2004). First we prepared a stock solution for subsequent sample preparation of other test concentrations, 200μL of plasma were added to an Eppendorf tube and mixed with 100 μL of hydrogen peroxide

solution of 100 μM (dilution 1: 10), and 200 μL of *N. cochenillifera*. The positive control was composed entirely of plasma 200 μL , and 100 μL of hydrogen peroxide solution 100 μM (1:10 dilution). For the negative control, we added 200 μL of PBS buffer. An aliquot of 50 μL was taken from each solution and added to 4 mL of Tris HCl buffer (dilution 1:80). In the subsequent steps, a test tube containing the sample and another to be used as the blank were prepared for each concentration and control. In the first step, 1000 μL of concentrations or controls previously prepared were added to both tubes. To the sample tube was added 200 μL of 2,4-dinitrophenylhydrazine (DNPH) and to the respective blank tube was added 200 μL of hydrochloric acid (HCl) 2N. All tubes were incubated for 1 hour at room temperature, and agitated every 15 minutes. From this point, the steps were identical for both the sample tube and its respective blank. 500 μL of denaturing buffer and 2000 μL of hexane were added. All tubes were agitated for 30 seconds and centrifuged at 3000 rpm for 15 minutes. The supernatants were removed and the pellets held on the tube edge, for subsequent re-suspension in 1 mL of denaturation buffer.

All the tubes were brought to 50 °C for 20 minutes in a water bath until dissolution of the pellets. Absorbance was read in a spectrophotometer at 370 nm, resetting the device with the respective blank of each sample.

Free radicals

The determination of the total amount of free radicals in the sample was determined by spectrofluorimetric method using dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA) according to Arai et al., (2004). The sample was diluted (1:10) in Tris/HCl 10 mM buffer. Then 50 μL of diluted plasma was incubated in 10 mM Tris/HCl, and 10 μM DCHF-DA at 37 °C for 30 min. The DCF fluorescence emission intensity was measured using a Perkin-Elmer LS-55 spectrofluorimeter at an excitation wavelength of 488 nm, and an emission wavelength of 520 nm, 20 minutes after the addition of the DCHF-DA medium.

Analysis of genotoxicity parameters

Cell proliferation and viability

Cell viability was assessed by membrane integrity loss, using trypan blue. The samples in their respective concentrations were combined with Turk's solution (3% acetic acid plus 1% gentian violet in water), and after three minutes were placed in a Neubauer chamber. The differentiation between live/dead cells was observed by the blue staining of the dead cells. The total leukocyte (proliferation) was achieved by means of the total count of 300 cells in a Neubauer chamber.

Micronuclei Frequency

For micronuclei analysis, the cells were placed in a centrifuge tube with saline, and centrifuged at 1000 rpm for 5 minutes. Ten milliliters (with the cell pellet) was dispersed over the slide and dried at room temperature. The slides were stained by panoptic method and then analyzed by light microscopy with immersion lens. 1000 cells were counted for each slide.

DNA comet assay

The comet assay was performed according to Singh et al. (1995). The samples, after incubation (leukocytes) were mixed with 1.5% agarose and placed on a microscope slide pre-

coated with agarose. The slides were immersed in a lysis solution and held under electrophoresis (20 min at 300 V, and 25 mA). Afterwards, the slides were neutralized and allowed to dry at room temperature. The dried slides were rehydrated and then fixed for 10 min; then allowed to dry again. The last step was staining and the use of stop solution. The DNA damage is given as the damage index (DI) computed from cells in different damage classes ranging from zero (no damage) to 4 (maximum damage). The sum of the values provides the damage index for each treatment. The index ranges from 0 (0 x 100 cells) and 400 (4 x 100 cells).

***In vitro* cytotoxicity assay with NCTC 929 cell culture**

In vitro assays were performed using Mouse Connective Tissue (NCTC) clone 929 (mammalian fibroblasts ATCC CCL-1) cell culture strain, incorporating neutral red dye (Nogueira et al. 2008). The cells were maintained in Eagle's minimum essential medium (MEM) with 0.1 mM of nonessential amino acids, 1 mM sodium, and supplemented with 10% fetal bovine serum. The adhesion cells were trypsinized, and the cell suspension adjusted to 2×10^5 cells/mL. A volume of 0.2 mL of cell suspension was added to each well of a 96 well plate and placed in a CO₂ incubator at 37 °C for 24 h. Next, the cells were exposed to the extract of *N. cochenillifera* cladodes at concentrations of 0.78 mg/mL; 1.56 mg/mL; 3.12 mg/mL; 6.25 mg/mL, 12.49 mg/ml and as control we used the culture medium. Each concentration was tested in triplicate and the neutral red extracted with acetic acid solution 1% in 50% ethanol. The absorbance was measured at 540 nm in a microplate reader Thermo Scientific Multiskan FC (Vantaa, Finland) was determined.

Cytotoxicity assay, in vitro CHO cells culture

Assays were performed *in vitro* using Chinese Hamster Ovary (CHO) cell line culture, by incorporation of neutral red dye (Nogueira et al. 2008). The cells were maintained in RPMI 1640 broth, supplemented with 5% fetal bovine serum. The adhesion cells were trypsinized, and the cell suspension adjusted to 2×10^5 cells/mL. A 0.2 mL volume of cell suspension was added to each well of a 96 well plate and placed in a CO₂ incubator at 37 °C for 24 h. Next, the cells were exposed to the extract *N. cochenillifera* cladodes at concentrations of 0.19 mg/mL; 0.39 mg/mL; 0.78 mg/mL; 1.56 mg/mL; and 3.12 mg/mL, as control we used culture medium. Each concentration was tested in triplicate, and the neutral red extracted with 1% acetic acid solution in 50% ethanol. The absorbance at 540 nm was determined in a microplate reader Multiskan FC Thermo Scientific (Vantaa, Finland).

Statistical Analysis

The analyses were assessed by analysis of variance (ANOVA) followed by post-hoc Bonferroni testing. Results were considered significant with $p < 0.05$. The results were expressed as mean \pm standard deviation. The cytotoxicity assay was assessed by probit method.

RESULTS

Oxidative profile

Total Free Radicals

The results of the amount of reactive oxygen species demonstrate that *N. cochenillifera* at a concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ ($92.78 \pm 9.05\%$), and 100 $\mu\text{g/mL}$ ($132.16 \pm 9.30\%$) was similar to the negative control PBS 7.4 ($99.33 \pm 0.33\%$), while the concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ ($209.95 \pm 30.12\%$) was statistically similar to the positive control H_2O_2 ($199.66 \pm 7.83\%$) (Figure 2).

Lipid Peroxidation

The lipid peroxidation assay (Figure 3) *N. cochenillifera* at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ showed statistically similar results (2.22 ± 0.11 nMol MDA/mL) to those of the negative control (1.54 ± 0.04 nMol MDA/mL). Concentrations of *N. cochenillifera* at 100 $\mu\text{g/mL}$ (3.79 ± 0.27 nMol MDA/mL) and 500 $\mu\text{g/mL}$ (3.78 ± 0.27 nMol MDA/mL) showed no statistically similar results to the positive control (4.95 ± 0.16 nMol MDA/mL), suggesting no oxidative stress.

Carbonyl Proteins

The dosage of carbonyl proteins (Figure 4) showed that *N. cochenillifera* at a concentration of 10 $\mu\text{g/mL}$ (191.05 ± 2.97 nMol/mg) present the carbonylation index statistically similar to the negative control (132.92 ± 10.04 nMol/mg). In the concentrations of 100 $\mu\text{g/mL}$ (238.38 ± 13.19 nMol/mg) and 500 $\mu\text{g/mL}$ (254.82 ± 9.71 nMol/mg) were statistically different from the positive control H_2O_2 (383.46 ± 0.97 nMol/mg), showing reductions in protein damage.

Genotoxicity

Cell proliferation

The results of determining *N. cochenillifera* effect on the proliferation of white blood cell cultures are shown in Figure 5. There was no statistically significant difference in the number of white blood cells comparing the three concentrations of *Nopalea* extracts with the negative control.

Cell viability

All *N. cochenillifera* concentrations maintained cell viability except the most concentrated solution (500 $\mu\text{g/mL}$), which showed a reduction in the percentage of cell viability, yet statistically different from the positive control (H_2O_2) (Figure 6).

Micronuclei Frequency

N. cochenillifera exposed cells revealed low micronuclei counts, with statistically significant differences from the positive control (figure 7).

DNA damage

In the comet assay *N. cochenillifera* extract (at a concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$) showed a damage index of 12, not maintaining statistical equivalence to the positive control that present of damage index 39. Concentrations at 100 and 10 $\mu\text{g/mL}$ showed indexes (DIs) of 7 and 4,

respectively, statistically similar to the negative control (DI 2), suggesting that there was no significant DNA damage. The damage index decreased with the decreases in the sample concentration (figure 8).

Cytotoxicity

Cytotoxic activities and NCTC clone 929 cells and have the following cytotoxicity index (Table1).

DISCUSSION

Oxidative profile

The relative concentrations of reactive oxygen species were elevated only in the smallest concentration of *N. cochenillifera* tested (10 µg/mL) where values were statistically similar to that induced by the positive control with H₂O₂. However, the concentrations of 100 and 500 µg/mL were similar to the negative control. This can be explained by the higher antioxidant content present in the higher concentration samples. The concentration of free radicals may increase due to increased intracellular generation or because of deficiencies in antioxidant mechanisms. The body itself is capable of decrease the usual consequences of free radicals, however, there are situations where these defense mechanisms are not sufficient to prevent and repair the damage caused by this unwanted reactions.

When assessing damage to the plasma proteins lipids, none of the tested concentrations showed statistical similarity to the positive control. The *N. cochenillifera* in the concentration of 10 µg/mL was 56% lower than the positive control. Guez (2014) demonstrated that *Ocimum basilicum* L. at a concentration of 35.44 µg/mL was 41.81% less than the positive control by the same methodology used in this study. The main "ROS susceptible" molecules are the lipids present in the cell membranes, proteins, and nucleic acid molecules, such as DNA. Oxidative stress in the membranes is generally known as lipid peroxidation, while oxidative stress in DNA, is generally reported as genotoxicity (Santos Montagner et al. 2010).

The proteins are immediate targets for oxidative modifications caused by ROS, changing their structures, causing protein fragmentations and loss of function. The formation of carbonylated proteins appears to be a common phenomenon during oxidation, and quantification can be used to measure the extent of oxidative damage (Beal et al. 2003; Dalle-Donne et al. 2003). Carbonylated protein content is the most widely used and generalized indicator for protein oxidation, and such accumulation has been observed in many human diseases (Dalle-Donne et al. 2003). *Nopalea cochenillifera* exhibited no protein carbonyl damage in the concentrations tested, as all were statistically different from the positive control. *N. cochenillifera*, at the concentration of 10 µg/mL, presented protein carbonyl damage 51% lower than the positive control. By the same method, Guez (2014) demonstrated that *Ocimum basilicum* L. extract at a concentration of 35.44 µg/mL was 28% lower than the positive control. Malheiros (2014) demonstrated that concentrations of 50 and 10 µg/mL of aqueous extract of *Ceiba speciosa* presented protein content similar to that of the negative control, suggesting that in addition to oxidative damage not occurring in proteins, the species showed potential antioxidant activity, since there had been prior induced damage with 10 µM H₂O₂ in conducting the test. In other concentrations (5 and 2 µg/mL) of both samples, results similar to the positive control were observed, therefore suggesting the occurrence of oxidative damage.

Cytotoxicity and genotoxicity

The cytotoxicity of *N. cochenillifera* extracts was investigated in human leukocytes using the Trypan blue exclusion method. In this method, dead cells allow passage of trypan blue into the cytoplasm due to loss of membrane selectivity (Stoddart 2011). Here, visual analysis of the cells using a Neubauer chamber allowed counting the number of dead (trypan blue positive) and living (trypan blue negative) cells. The trypan blue exclusion test is a fast, simple and inexpensive method for assessing cell viability in response to cellular injury (Louis et al. 2011; Roy et al. 2015). Duarte et al. (2016) analyzed ethanolic extracts of *Raphiodon echinus* by the same methodology of this study and found that at concentrations of 30-480 $\mu\text{g/mL}$ did not induce cytotoxicity in human leukocytes, whereas the cell viability remained 90%. In this study the extracts of *N. cochenillifera* at concentrations of 10- 500 $\mu\text{g/mL}$ had similar results.

The micronucleus test is a quick and simple test that detects chromosomal losses and breaks, and is thus suitable for assessing mutagenic effects (Fenech et al. 2003). This test has been used as a fundamental tool to verify mutagenic activity in many plant extracts (Albertini et al. 1997). Bonassi et al. (2011) showed that the micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes is predictive of the risk of cancer. In the 10 μM H_2O_2 treatment, the micronuclei count was high, and significantly different from the other treatments. The cells exposed to *N. cochenillifera* presented low micronuclei counts with statistically significant differences from the positive control. This suggests that *N. cochenillifera* didn't cause mutagenic effects at the concentrations tested (Figure 7). The micronucleus test differs from the comet assay in the type of variation detected in the DNA. The micronucleus test detects irreparable injury, while the comet assay detects primary lesions, which are amenable to correction (Valentim Severin et al. 2003).

Guez et al. (2012) found that the aqueous extract of *Xanthium spinosum* showed no significant damage index on the three concentrations (0.02 g/L, 0.1 g/L, to 0.2 g/L) by comet assay in cultured human leukocytes. Although the damage at concentrations (0.1 and 0.2 g/L) were higher than the negative control, the authors consider absence of genotoxicity because they were statistically lower than the positive control. In the comet assay *N. cochenillifera* extract at a concentration of 500 $\mu\text{g/mL}$ not maintaining statistical equivalence to the positive control. Concentrations at 100 and 10 $\mu\text{g/mL}$ showed indexes statistically similar to the negative control suggesting that there was no significant DNA damage. The damage index decreased with the decreases in the sample concentration.

The use of *N. cochenillifera* in traditional medicine, with limited knowledge about their toxic effects, especially on genetical material demonstrates the importance of in-depth studies. From a scientific point of view, researches demonstrates that many plants have potentially harmful substances and should be used with caution, respecting their toxicological risks. Experimental studies have scientifically-proven the pharmacological activity of *N. cochenillifera*, however, to extrapolate these results to humans, is essential the realization of additional studies to determine the absence of toxicity. The cytotoxic activity of *N. cochenillifera* in NCTC cells showed an IC_{50} concentration of 7.31 mg/mL. The cytotoxicity index for the extract was higher than the IC_{50} found for the species *Morus alba* (IC_{50} 3.24 mg/mL), with the same methodology used for all analyses (Pereira et al. 2012). Thus, *N. cochenillifera* showed less cytotoxicity as compared to other extracts, since a higher sample concentration was needed to reach IC_{50} , showing that it would be safer for use as a therapeutic. The cytotoxicity of *N. cochenillifera* extract against CHO cells was 6.24 mg/mL. Machado (2012) found, with the same methodology of this study, that the extract *Sida rhombifolia* presented IC_{50} 8.88 mg/mL (aerial parts of the plant) and IC_{50} 12.7 mg/mL (roots) against the NCTC cells. According to National Institutes of Health (38), *in vitro* data can be useful in estimating the starting doses for *in vivo* acute toxicity tests, reducing the number of animals required for such determinations. The data encourage new studies to determine substances that contribute to biological activities, to understand their

mechanisms of action, and to evaluate toxicity, looking forward towards pharmaceutical applications.

CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that there is no conflict of interest.

REFERENCES

Albuquerque, U.P., Hanazaki, N. (2006): Ethnodirected research in the discovery of new drugs of medical and pharmaceutical interest: flaws and perspectives. *Braz J Pharmacog.* **16**, 678-689.

Arai, T., Yamada, H., Namba, T., Mori, H., Ishii, H., Yamashita, K., Sasada, M., Makino, K., Fukuda, K. (2004): Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions. *Biochem Pharmacol.* **67**, 1185-1193.

Barbosa, M., Mayo, S., Castro, A., Freitas, G., Pereira, M., Neto, P., Moreira, H., 1996 Checklist preliminar das angiospermas in Pesquisa botânica nordestina. Progresso e perspectivas (E. Sampaio, S. Mayo & M. Barbosa, eds.) Pesquisa SBB, Recife, 253-415.

Beal, D.J., Cohen, R.R., Burke, M.J., Mclendo, C.L. (2003): Cohesion and performance in groups: A Meta-analytic clarification of construct relations. *Journal of Applied Psychology.* **88**, 989-1004.

Bonassi, S., El-Zein, R., Bolognesi, C., Fenech, M. (2011): Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. *Mutagenesis.* **26**, 93–100.

Burow, M.E., Weldon, C.B., Tang, Y. Navar, G.L., Krajewsky, S., Reed, J.C., Hammond, T.G., Clejan, S., Beckman, B.S. (1998): Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants. *Cancer Res.* **58**, 4940-4946.

Calixto, J.B. (2000): Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res.* **33**, 179-189.

Cetto, A.A., Heinrich, M. (2005): Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes J. *Ethnopharmacol.* **99**, 325-348.

Collins, A.R. (2004): The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Mol Biotechnol.* **26**, 249–261.

Dalle-Donne, I.R., Rossi, D., Giustarini, A., Milzani, A. (2003): Colombo, Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. *Clinica Chimica Acta.* **329**, 23–38.

Duarte, A.E., Waczuk, E.P., Roversi, K., Da Silva, M.A.P., Barros, L.M., Da Cunha, F.A.B., De Menezes, I.R.A., Da Costa, J.A.M., Boligon, A.A., Ademiluyi, A.O., Kamdem, J.P., Rocha, J.B.T., Burger, M.E. (2016): Polyphenolic Composition and Evaluation of Antioxidant Activity, Osmotic

Fragility and Cytotoxic Effects of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. *Molecules*. **21**, 2-15.

Fenech, M., (2000): The *in vitro* micronucleus technique. *Mutation Research*. **455**, 81-95.

Fenech, M., Cheng, W.P., Kirsch-Volders, M., Holland, N., Bonassi, S., Zeiger, E. (2003): HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutation Research*, **534**, 65-75.

Gomes-Flores, R., Tamez-Guerra, P., Tamez-Guerra, R., Rodriguez-Padilha, C., Monreal-Cuevas, E., Hauad-Marroquim, L.A., Cordova-Puente, C., Range-Llanas, A. (2006): *In vitro* antibacterial and antifungal activities of *Nopalea cochenillifera* pad extracts. *American journal of infectious diseases*. **1**, 1-8.

Guez, C.M., Waczuk, E.P., Pereira, K.B., Querol, M.V.M., Da Rocha, J.B.T., De Oliveira, L.F.S. (2012): *In vivo* and *in vitro* genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Science*. **48**, 461-467.

Guez, C.M., (2014). Evaluation of the effects of hydroalcoholic extract of basil (*Ocimum basilicum* L.) on oxidative, inflammatory and genotoxic parameters in human culture leukocyte. Masters Dissertation, UNIPAMPA, Post Graduate Pharmaceutical Sciences.

Harvey, A. (2000): Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. *Drug Discovery Today*. **5**, 294-300.

Hunt, D., Taylor, N. (1990): The genera of Cactaceae - Progress Toward Consensus. *Bradleya*. **8**, 85- 107.

Louis, K.S., Siegel, A.C. (2011): Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. *Methods in Molecular Biology*. **740**, 7-12.

Macedo, A.F., Oshiiwa, M., Guarido, C.F. (2007). Occurrence of the use of medicinal plants by residents of a municipality of the district of Marilia-SP. *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. **28**,123-128.

Machado, L. (2012): Quality control and biological activities of *Sida rhombifolia* L Master Disertation. Graduate Program in Pharmaceutical Science, Federal University of Santa Maria, Brazil.

Marques, R.C.P. Medeiros, S.R.B., Dias, C.S., Filho, J.M.B., Lima, L.F.A. (2003): Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. *Mutation Research*. **536**, 117-120.

Morabito, F., Cristiani, M., Saija, A., Stelitano, C., Callea, V., Tomaino, A., Minciullo, P.L., Gangemi, S., (2004): Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. *Mediators of Inflammation*. **13**, 381–383.

Malheiros, C.K.C (2014): Avaliação Preliminar *in vitro* do potencial antioxidante e da toxicidade de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna (Paineira), Masters Dissertation, UNIPAMPA, **Post Graduate Pharmaceutical Sciences**.

Morris, W., Gomes, S., Allen, M. (2012): International classification of traditional medicine. *Global Advances in Health and Medicine*, **4**, 38-41.

National Institute of Health. (1996): *The Guide for the Care and Use of Laboratory Animal*. Washington, D.C.: National Academy Press.

Necchi, R.M.M., Maki, T.D.T., Do Canto, G.S., Moresco, R.N., Dalmora, S.L., Manfron, M.P., (2011): Antiinflammatory activity and biochemical parameters of the ethanol extract of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae) *Lat Am J Pharm.* **30**, 786-789.

Necchi, R.M.M., Alves, I., Alves, S.H., Manfron, M.P. (2012): *In vitro* antimicrobial activity, total polyphenols and flavonoids contents of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae). *Research in Pharmacy*. **2**, 01-07.

Necchi, R.M.M., Zanetti, G.D., Maki, T.D.T., Royer, L.J., Manfron, M.P. (2010): Morphology and histochemistry of cladodes of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae). *Lat Am J Pharm.* **29**, 422- 427.

Nogueira, D.R., Sangoi, M.S., Silva, L.M., Todeschini, V., Dalmora, S.L. (2008): Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. *J Sep Sci.* **31**, 3098-3105.

Ohkawa, H., Ohishi, L., Yagi, K. (1979): Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Analytical Biochemistry*. **95**, 351-358.

Park, E.H., Kahng, J.H., Lee, S.H., Shin, K.H. (2001): An anti-inflammatory principle from cactus. *Phytotherapy*. **72**, 165-167.

Pereira, C.B., Marin, A., Dalmora, S.L., Necchi, R.M.M., Rossato, L., Alves, S.H., Manfron, M.P., (2012): Antimicrobial activity and cytotoxicity of the crude extract obtained from *Morus alba* L. (Moraceae). *Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences*. **33**, 133-137.

Rehman, S,U, Choe, K., Yoo, H.H. (2016): Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. *Molecules*. **21**, 331- 341.

Roy, P., Mukherjee, A., Giri, S. (2015): Evaluation of genetic damage in tobacco and arsenic exposed population of Southern Assam, India using buccal cytome and comet assay. *Ecotoxicol Environ Saf.* **124**, 169–176.

Santos Montagner, G.F.F., Sagrillo, M., Machado, M.M., Almeida, R.C., Mostardeiro, C.P., Duarte, M.M., Da Cruz, I.B. (2010): Toxicological Effects of ultraviolet radiation on lymphocyte

cells with different manganese superoxide dismutase Ala16val polymorphism genotypes. *Toxicology In Vitro*. **24**, 1410-1416.

Speit, G., Hartmann, A. (2005): The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. *Methods Mol Biol*. **291**, 85–95.

Stoddart, M.J. (2011): Cell viability assays: Introduction. *Methods Mol Biol*. **740**, 1–6.

Schmid, W. (1975): The Micronucleus Test. *Mutation Research*. **31**, 09-15.

Singh, N.P., McCoy, M.T., Tice, R.R., Schneider, E.L. (1995): A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. *Experimental Cell Research*. **175**, 184–191.

Tice, R.R, Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J.C., Sasaki, Y.F., (2000): Single cell gel/comet assay: guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ Mol Mutagen*. **35**, 206–221.

Valentin-Severin, I., Le Hegarat, L., Lhuguenot, J.C., Le Bon, A.M., Chagnon, M.C. (2003): Use of HepG2 cell line for direct and indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*. **536**, 79- 90.

Veiga Junior, V.F. (2008): Study of the medicinal plants consumption in the Middle-North Region of the Rio de Janeiro State: acceptance by health professionals, way of use of the population. *Braz J Pharmacog*. **18**, 308-313.



Figure 1. *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dick (Cactaceae).

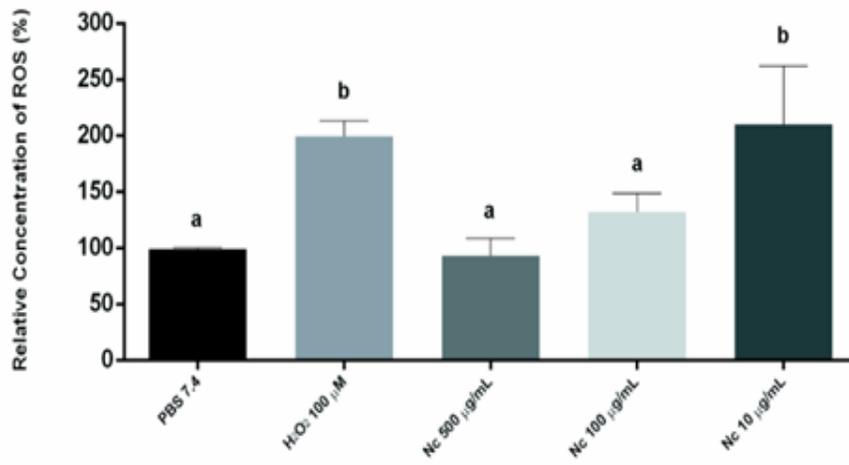


Figure 2. Relative concentrations of free radicals in different concentrations of the extract *Nopalea cochenillifera*. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$).

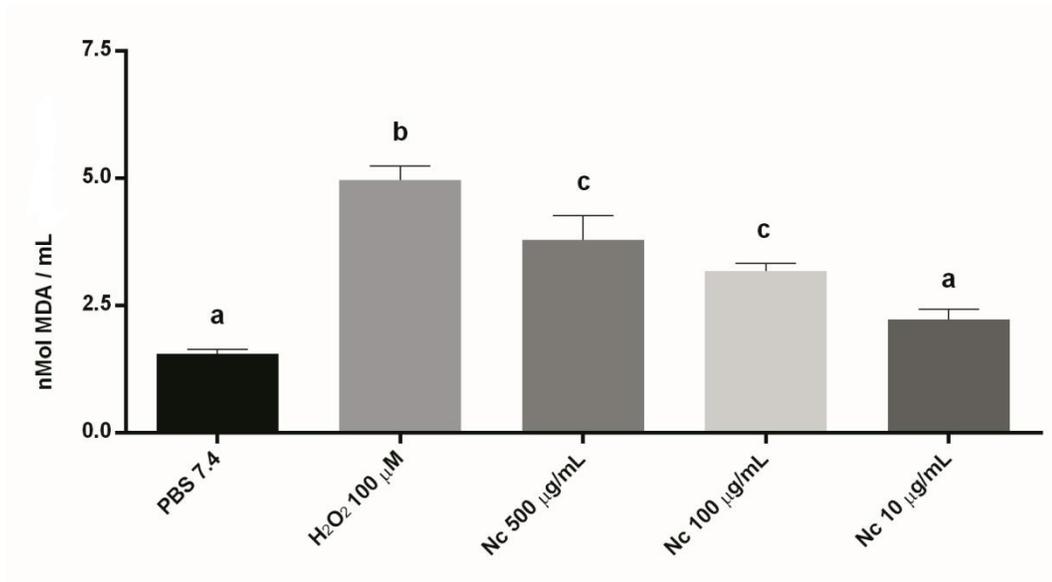


Figure 3. Lipid peroxidation in plasma; damage induced by H₂O₂ 10μM. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$).

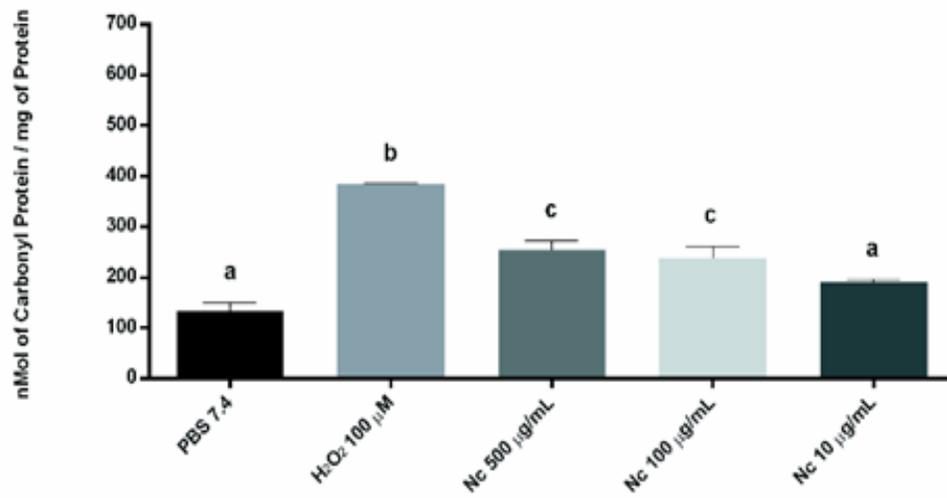


Figure 4. Plasma carbonyl protein dosage results with damage induced by H₂O₂ at 10μM. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$).

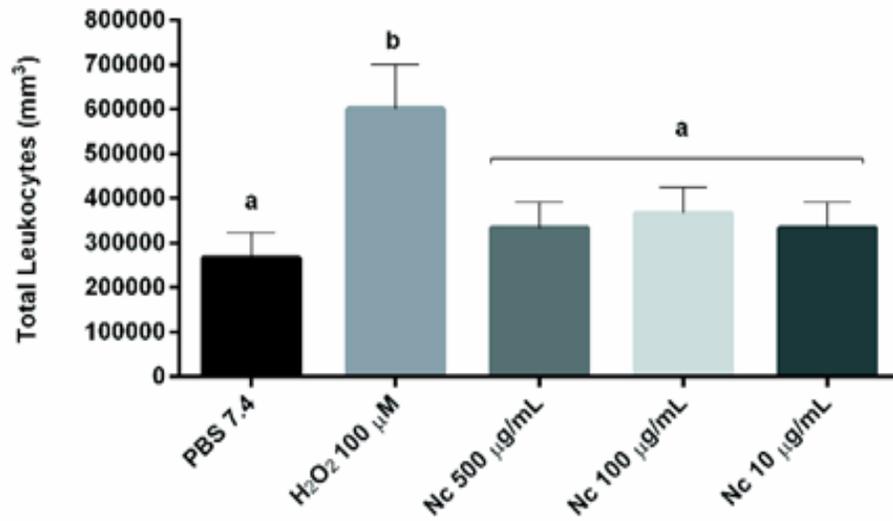


Figure 5. Effects of *N. cochenillifera* on human leukocyte cultures. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$).

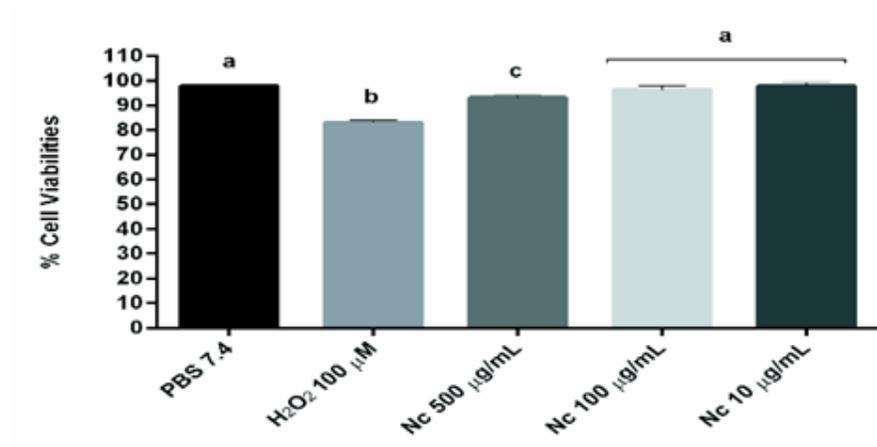


Figure 6. Leukocyte cell viability measured by trypan blue dye after exposure to different concentrations of *N. cochenillifera*. Data are expressed as mean ± SEM. Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$).

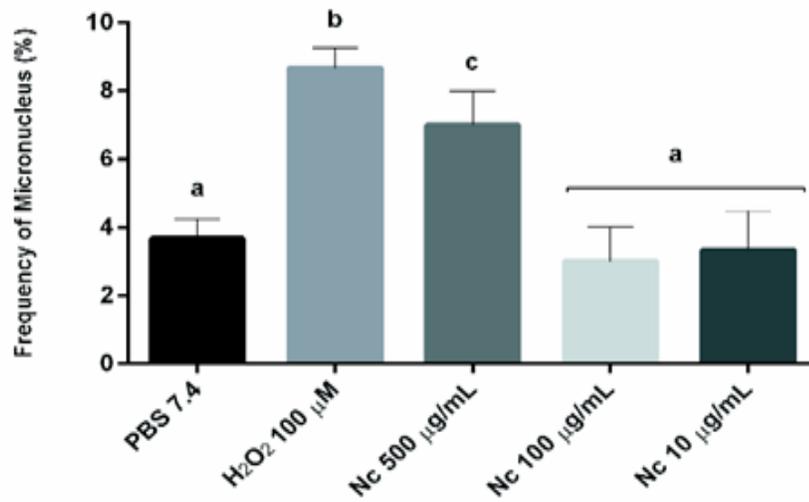


Figure 7. Effects of *N. cochenillifera* on the production of micronuclei in cell cultures. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$).

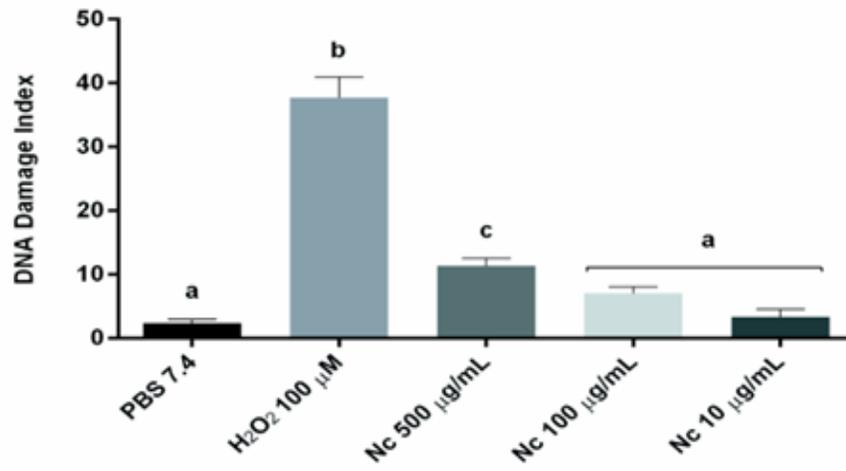


Figure 8. Result of the comet assay in human leukocytes. Data are expressed as mean \pm SEM. Different letters represent statistically different results ($p < 0.05$).

Table 1 - IC₅₀* of *N. cochenillifera* extract against NCTC and CHO cells

Test	IC₅₀%	IC_{50l}	IC_{50s}
NCTC	7.31 mg/mL	6.19 mg/mL	8.91 mg/mL
CHO	6.24 mg/mL	5.25 mg/mL	8.94 mg/mL

* IC₅₀ Inhibitory concentration 50 - level that causes cell death of 50% cells. IC_{50l}: confidence interval lower. IC_{50s}: upper confidence interval.

4. DISCUSSÃO GERAL

O uso de plantas medicinais no tratamento adjuvante de doenças é constante pela população, porém muitas plantas não possuem comprovação científica de seus efeitos biológicos e toxicológicos. O uso indiscriminado pode levar a sérios efeitos ao organismo, gerando muitas vezes lesões aos órgãos e tecidos. Baseado nisso, é necessário ressaltar a importância de estudos a respeito das plantas utilizadas pela população, uma vez que muitas delas apresentam relato de uso estritamente local e podem oferecer uma alternativa de tratamento para diversas doenças, ou representar um severo fator de toxicidade e interação medicamentosa para seus usuários (CARLINI et al., 2006).

Além de planta medicinal, os cladódios das cactáceas estão sendo utilizados na dieta humana como fonte de energia. A planta pode ser usada para fazer sucos, saladas, pratos guisados, cozidos e doces (CHIACCHIO, 2006). O preconceito e a falta de informação detalhada de cada espécie são os maiores obstáculos na aceitação deste alimento.

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) e a Ingestão Adequada (IA) são níveis de ingestão recomendados para indivíduos e são aplicados para a população saudável em geral. A IDR é a ingestão média diária de nutrientes suficiente para obter as necessidades nutricionais de quase todos os indivíduos saudáveis. IA é a ingestão média diária de nutrientes recomendada considerada adequada, porém seus valores são baseados em estimativas. Tanto a IDR como a IA são usadas como meta para as ingestões individuais e assim, ambas representam níveis recomendados de ingestão para indivíduos (IOM, 1997; IOM, 2000; IOM, 2004).

A determinação dos minerais nos cladódios de *Nopalea cochenillifera* por Espectrometria de Absorção Atômica elucidada como *N. cochenillifera* pode contribuir para os aportes da IDR de cada nutriente. A ingestão foi calculada considerando os valores necessários para um homem adulto saudável. Os resultados demonstram que tanto a planta consumida na forma seca ou fresca pode contribuir para ingestão dos minerais analisados.

Dessimoni et al., (2014) analisaram a composição de minerais nos cladódios de uma cactácea da mesma família (*Opuntia ficus indica*) e verificaram as seguintes concentrações: cálcio 2836 mg/100g, potássio 1135 mg/100g, magnésio 1024 mg/100g, ferro 9 mg/100g e zinco 8,6 mg/100g. Os cladódios de *Opuntia ficus indica* são usados na alimentação humana na forma

de farinha, seca e moída, na forma fresca como verdura em saladas e refogados (BRASIL, 2002). Neste estudo, foi possível verificar que os teores de potássio, cálcio, magnésio e zinco são superiores a espécie *Opuntia ficus indica*.

O cálcio desempenha um papel na mediação da contração vascular e vasodilatação, contração muscular, transmissão nervosa e secreção glandular (IOM, 1997). O cálcio também tem sido inversamente associado à pressão sanguínea, embora com menos intensidade que o potássio (STEINBERG et al., 2003). Uma porção de apenas 16 g da planta seca *Nopalea cochenillifera* representa 100% da ingestão diária recomendada a um adulto saudável (IOM, 2004). Este nível de cálcio é significativo, em comparação com outras fontes de alimentos ricos em cálcio, e torna esta cactácea uma excelente fonte deste mineral na dieta.

O Magnésio catalisa várias reações biológicas, incluindo a síntese de proteínas, transmissão de impulsos nervosos, relaxamento musculares e produção de energia (STEIBERG et al., 2003; PLANELLS et al., 1997). A *N. cochenillifera* se apresenta como uma boa fonte também de magnésio uma vez que uma porção de cerca de 13 g pode fornecer 100% da IDR (400 mg) de magnésio (IOM, 1997).

O potássio é essencial para a manutenção da osmolaridade celular e dos potenciais de membrana; assim, exerce um papel no tônus vascular e em outras rotas bioquímicas relacionadas com a saúde cardiovascular, além disso, existe uma associação inversa entre a ingestão de potássio e a pressão sanguínea. No entanto, em pacientes que apresentam insuficiência renal, sua eliminação é reduzida, a qual pode levar a altos níveis de potássio com conseqüente perturbação da atividade muscular, principalmente no coração (STEINBERG et al., 2003; IOM, 2004). O teor de potássio em uma porção de 120 g da planta seca *N. cochenillifera* representa 100% da ingestão diária recomendada a um adulto saudável (IOM, 2004).

O potássio associado ao sódio exerce funções na condução de impulsos nervosos, contração e relaxamento muscular, na secreção de insulina e na conservação do equilíbrio ácido/base. O sódio está ligado diretamente a estas funções do potássio e é um importante elemento para a regulação da pressão arterial humana (IOM, 2004). O valor adequado de ingestão de sódio são 1500 mg diárias. Neste estudo, foi determinado que o elemento sódio está presente em baixa concentração nos cladódios de *N. cochenillifera*.

Os componentes minoritários, ferro e zinco, são elementos essenciais para o organismo. Ferro é necessário para a homeostase e é indispensável para os sistemas sanguíneo e muscular e o

zinco funciona como componente de várias enzimas na manutenção da integridade estrutural de proteínas e na regulação da expressão genética, bem como na função imunológica (IOM, 2000). A *N. cochenillifera* pode ser um veículo potencial para a suplementação destes metais. Porções de cerca de 75 g e 110g da planta seca fornecem 100% IDR de um adulto saudável, para zinco e ferro respectivamente. A composição química dos cladódios pode variar de acordo com o solo, o local do cultivo, a época do ano e da idade da planta (BATISTA et al., 2003), no entanto este estudo revela resultados inéditos desta espécie.

Com relação ao perfil oxidativo, *N. cochenillifera* demonstrou que a concentração relativa de espécies reativas de oxigênio foram elevadas apenas na menor concentração testada (10 µg/ml) onde os valores foram estatisticamente semelhantes ao controle positivo induzido com H₂O₂. No entanto, o extrato nas concentrações de 100 e 500 µg/ml foram semelhantes ao controle negativo.

Quando avaliado o dano aos lipídeos das proteínas plasmáticas em nenhuma das concentrações testadas demonstrou semelhança estatística ao controle positivo. *Nopalea cochenillifera* na concentração de 10 µg/ml apresentou resultado 56 % mais baixo que o controle positivo. Guez (2014) demonstraram que *Ocimum basilicum* L. na concentração de 35,44 µg/ml foi 41,81% menor que o controle positivo pela mesma metodologia deste trabalho.

O conteúdo de proteína carbonilada é o indicador mais geral e o mais utilizado para a oxidação de proteínas, e o seu acúmulo tem sido observado em várias doenças humanas (DALLE-DONNE, et al., 2003). *Nopalea cochenillifera* não demonstrou danos as proteínas carboniladas nas concentrações testadas, pois todas diferiram estatisticamente ao controle positivo. *Nopalea cochenillifera* na concentração de 10 µg/ml apresentou resultado 51 % menor que o controle positivo. Pela mesma metodologia Guez (2014) demonstraram que o extrato *Ocimum balicum* L. na concentração de 35,44 µg/ml foi 28% menor que o controle positivo. Malheiros (2014) demonstrou que as concentrações de 50 e 10 µg/ml do extrato aquoso de *Ceiba speciosa*, apresentaram índice de proteína semelhante ao controle negativo, sugerindo que além de não ocorrer dano oxidativo nas proteínas, a espécie apresentou potencial antioxidante, uma vez que houve prévia indução de dano com H₂O₂ 100 µM na realização do teste. Nas demais concentrações (5 e 2 µg/ml) de ambas as amostras foram observados resultados semelhantes ao controle positivo, sugerindo, portanto, a ocorrência de dano oxidativo.

Com relação ao estudo de genotoxicidade, quando analisamos o extrato de *N. cochenillifera* frente a proliferação celular de leucócitos, as concentrações de 500, 100 e 10 µg/ml

foram semelhantes estatisticamente ao controle negativo. A porcentagem de células viáveis analisadas utilizando o corante azul tripan demonstrou que nas três concentrações não foram estatisticamente semelhantes ao controle positivo. Na concentração de 500 µg/ml as quantidades de células viáveis diminuíram, mas ainda assim foram estatisticamente diferente ao controle positivo.

Malheiros, (2014) realizou o teste de viabilidade celular de *Ceiba speciosa* e revelou baixo potencial tóxico nas concentrações 50, 10, 5 e 2 µg/ml. De acordo com Collins et al., (2008) , a alta viabilidade das células é necessária como uma condição prévia para a realização do ensaio do cometa. Pois este exige, como condição prévia, uma alta viabilidade celular (COLLINS et al., 2008).

Com relação à frequência de micronúcleos as três concentrações do extrato de *N. cochenillifera* não foram estatisticamente semelhantes ao controle positivo. Na concentração de 500 µg/ml foi superior ao negativo, mas ainda não semelhante ao positivo. O ensaio de micronúcleos fornece um índice conveniente e confiável de quebras e perdas cromossômica (FENECH, 2000).

O ensaio de índice de dano ao DNA mostrou que o extrato de *N. cochenillifera* nas três concentrações testadas não demonstrou semelhança estatística com o controle positivo. Porém na concentração elevada (500 µg/ml) foi superior ao controle negativo, mas ainda inferior ao positivo. O teste cometa é um ensaio de genotoxicidade, portanto, detecta a fragmentação do núcleo através do arraste do DNA, que forma uma cauda quando o material genético é submetido a uma corrente elétrica em solução alcalina (HALLWELL; GUTTERIDGE, 2007). Wan-Ibrahim et al., (2010) realizaram um estudo com o extrato aquoso de 20 plantas comestíveis da Malásia, e verificaram que apenas duas delas apresentaram dano ao DNA maior do que 50%, indicando dano severo. O teste cometa não é a única forma de mensurar o dano oxidativo ao DNA, porém é um dos mais sensíveis e precisos, sendo relativamente livre de artefatos. É uma ferramenta importante no monitoramento de populações, como por exemplo, na avaliação do estresse oxidativo nas doenças humanas e monitoramento da dieta de antioxidantes (COLLINS, 2009). Malheiros (2004) observou que o extrato de *Ceiba speciosa* na concentração de cada 50 µg/mL apresentou dano de grau 1 ao DNA, considerando um dano de menor amplitude ao DNA possível ao DNA, ou seja, baixo potencial de toxicidade. *Nopalea cochenillifera* apresentou dano de grau 12 na

maior concentração testada (500µg/ml) sendo abaixo do controle positivo que apresentou dano grau 39. Dessa forma podemos verificar que *N. cochenillifera* não causou dano ao DNA.

O uso de *N. cochenillifera* como planta forrageira animais e na medicina tradicional e o escasso conhecimento sobre seus efeitos tóxicos, especialmente sobre o material genético demonstram a importância de estudos aprofundados. Assim, do ponto de vista científico, as pesquisas mostram que muitas plantas possuem substâncias potencialmente agressivas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos toxicológicos. Além disso, estudos experimentais têm prestado provas de que as atividades farmacológicas atribuídas a *N. cochenillifera* comprovam-se cientificamente. No entanto, para a extrapolação destes resultados para humanos é imprescindível a realização de estudos complementares que determinem a ausência de toxicidade, considerando a restrição dos parâmetros analisados.

A atividade citotóxica de *N. cochenillifera* em células NCTC apresentou IC₅₀ na concentração de 7,31 mg/ml. O índice de citotoxicidade encontrado para o extrato em estudo, foi superior ao IC₅₀ encontrado para a espécie *Morus alba* (IC₅₀ 3,24 mg/ml), sendo utilizada a mesma metodologia para todas as análises (PEREIRA et al., 2012). Dessa maneira, *N. cochenillifera* apresentou uma menor citotoxicidade quando comparada aos demais extratos, pois foi necessária uma maior concentração de amostra para se chegar ao IC₅₀, demonstrando ser mais segura sua utilização para fins terapêuticos. A citotoxicidade do extrato de *N. cochenillifera* frente a células CHO foi 6,24 mg/ml. Machado (2012) demonstrou que o extrato de *Sida rhombifolia* apresentou IC₅₀ 8,88 mg/ml (partes aéreas da planta) e IC₅₀ de 12,7 mg/ml (raízes) frente as células NCTC pela mesma metodologia do presente estudo.

Segundo National Institute of Health (1996) (NIH), dados *in vitro* podem ser úteis na estimativa das doses iniciais para os testes *in vivo* de toxicidade aguda, que irão reduzir o número de animais necessários para tais determinações. Os dados obtidos encorajam a realização de novos estudos a fim determinar as substâncias que contribuem para a atividade biológica, entender seu mecanismo de ação e avaliar a toxicidade, visando uma possível aplicação farmacêutica.

5 CONCLUSÕES

- Os cladódios de *Nopalea cochenillifera* podem ser considerados uma excelente fonte de nutrientes devido ao considerável teor de cálcio, potássio, magnésio, zinco e ferro; e baixo conteúdo de sódio;
- *Nopalea cochenillifera* pode ser excelente alternativa econômica de consumo.
- O extrato de *N. cochenillifera* apresenta potencial antioxidante frente a peroxidação lipídica, quantidade de proteínas carboniladas e quantidade de radicais livres totais nas concentrações testadas.
- O extrato de *N. cochenillifera* não apresenta genotoxicidade nas concentrações testadas frente à cultura de leucócitos humanos induzidas com peróxido de hidrogênio;
- O extrato de *N. cochenillifera* apresenta atividade citotóxica frente às células NCTC clone 929 e CHO, que demonstram segurança para o uso humano.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMED, M.S et al. Antiinflammatory flavonoids from *Opuntia dillenii* (Ker-Gawl) Haw. flowers growing in Egypt. **Phytother Res.** v. 19, n. 9, p. 807-809, 2005.

ALAM, M.N.; BRISTI, N.J.; RAFIQUZZAMAN, M. Review on in vivo and in vitro methods evaluation of antioxidant activity. **Saudi Pharmaceutical Journal**, n. 2, v. 21, p. 143-152, 2013.

ALBERTINI, S.; KIRSCH-VOLDERS, M. Summary and conclusions on the MNT *in vitro* and implication on testing strategies. **Mutat Res**, v. 392, p. 183–185, 1997.

ALBERTINI, R.J et al. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. **Mutat Res**, v. 463, p. 111-172, 2000.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed,. p. 235-331, 2004.

ALBUQUERQUE, U.P.; HANAZAKI, N. Ethnodirected research in the discovery of new drugs of medical and pharmaceutical interest: flaws and perspectives. **Braz J Pharmacog**, v. 16, p. 678-689, 2006.

ALMEIDA, M.M.B. et al. Determinação de Nutrientes Minerais em Cinco Plantas Mediciniais. **Ciênc Tecnol Aliment Campinas**, v. 22, p. 94-97, 2002.

ALONSO-CASTRO J.A. et al. Medicinal plants used in the Huasteca Potosina, México. **J. Ethnopharmacol**, v. 143, p. 292–298, 2012.

ALVES, E.A.; GUIMARÃES, A.C.R. IN: MOLINARO, E. M.; CAPUTO, L. F. G.; AMENDOEIRA, M. R. R. **Conceitos e Métodos para a Formação de Profissionais em Laboratórios de Saúde**. v. 2, Rio de Janeiro: EPSJV; IOC, 2010.

ANDRADE, E.C.B; ALVES, S.P; TAKASE, I. Avaliação do uso de ervas medicinais como suplemento nutricional de ferro, cobre e zinco. **Cienc Tecnol Aliment**, v. 25, p. 591-596, 2005.

AQUINO, I. **Efeito genotóxico da Artemisinina e do Artesunato em células de mamíferos.** Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) – Instituto de Biociências (UNESP), Botucatu, São Paulo, 2010.

ARAI, T. et al. Effects of intracellular reactive oxygen species generated by 6-formylpterin on T cell functions. **Biochem Pharmacol**, v. 67, p. 1185-1193, 2004.

ARRUDA, E.; MELO-DE-PINA, G.F; ALVES, M. Anatomia dos órgãos vegetativos de Cactaceae da caatinga pernambucana. **Revista Brasileira de Botânica**, n.3, v. 28, p. 589-601, 2005.

AZEVEDO, A.P.S. Contribuição ao estudo anatômico histoquímico da espécie *Datura suaveolens* Humb et Bompl. Ex. WILLD. Comparando o perfil fitoquímico de amostras coletada nos meses de março e junho. 1998. 67f. Monografia (Trabalho de Graduação em Farmácia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 1998.

BAILEY, A.E. **Bailey's Industrial Oil and Fat Products.** 5th ed, v. 3, John Wiley:New York, 1996.

BALASUNDRAM, N.; SUNDRAM, K.; SAMAN, S. Phenolic compound in plants and agriindustrial by-products: antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chemistry**, v. 99, p. 191–203, 2006.

BARBERA, G. **História e importância econômica e agroecologia.** In: AGROECOLOGIA, CULTIVO E USOS DA PLANTA FORRAGEIRA. Paraíba: SEBRAE/PB, p. 1-11, 2001.

BARBOSA, M.; MAYO, S.; CASTRO, A.; FREITAS, G.; PEREIRA, M.; NETO, P.; MOREIRA, H. **Checklist preliminar das angiospermas in Pesquisa botânica nordestina.** Progresso e perspectivas (E. Sampaio, S. Mayo & M. Barbosa, eds.) Pesquisa SBB, Recife, p. 253-415, 1996.

BARNES, J.; ANDERSON, L. A.; PHILLIPSON, J.D. St John's wort (*Hypericum perforatum* L.): a review of its chemistry, pharmacology and clinical properties. **J. Pharm. Pharmacol**, n. 5, v. 53, p. 583-600, 2001.

BARREIROS, L.B.S.; DAVID, J. M.; DAVID, J.P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesas do organismo. **Química Nova**, São Paulo, n. 1, v. 29, 2006.

- BARROSO, G.M.; PEIXOTO, A.L.; ICHASO, C.L.F.; GUIMARÃES, E.F.; COSTA, C.G. Sistemática de angiospermas do Brasil. 2ª ed. Viçosa, 2002.
- BARTHLOTT, W.E; HUNT, D.R. Cactaceae. In: Kubitzki, K. **The families and genera of vascular plants**, Berlin, Springer, v. 2, p. 161-197, 1993.
- BATISTA, M.M.F. et al. Efeito da omissão de macronutrientes no crescimento, nos sintomas de deficiências nutricionais e na composição mineral em gravioleiras (*Annona muricata*). **Rev Bras Frutic** v. 25, p. 315-318, 2003.
- BEAL, D.J. et al. Cohesion and performance in groups: A Meta-analytic clarification of construct relations. **Journal of Applied Psychology**, n. 5, v. 88, p. 989-1004, 2003.
- BENNETT, R.N.; WALLSGROVE, R.M. Secondary metabolites in plant defense mechanisms. **New Phytol.** v. 127, p. 617-633, 1994.
- BERLETT, B.S; STADTMAN, ER. Oxidação de proteínas no envelhecimento, doenças e estresse oxidativo. **J. Biol. Chem.** v. 372, p. 20313-20316, 1997.
- BERRA, C.M.; MENCK, C.F.M. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Química Nova**, São Paulo, v. 29, p. 1340-1344, 2006.
- BIANCHI, M.L.P; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, n. 2, v. 12, p. 123-130, 1999.
- BIESALSKI, H.K. Free radical theory of ageing. **Curr Opin Clin Nutr Metab Care.** v. 5, p. 5–10, 2002.
- BONASSI, S. et al. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, p. 93–100, 2011.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política nacional de plantas medicinais e**

fitoterápicos/ Ministério da Saúde, Secretária de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos, Departamento de Assistência Farmacêutica – Brasília: Ministério da Saúde, 2006. 60 p. – (Série B. Textos Básicos de Saúde).

BRASIL, Ministério da Saúde, SPS, CGPAN. **Alimentos regionais brasileiros**. Ministério da Saúde, SPS, CGPAN. 1 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2002, 141p.

BRENDLER-SCHWAAB, S. et al. The *in vivo* comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, p. 245-254, 2005.

BRUSCHI, M.L.; FRANCO, S.L.; NOVELLO, C.R. Projeto de Manipulação e desenvolvimento de medicamentos e correlatos a base de plantas na disciplina de farmacotécnica. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 16, 2000. Recife. **Anais**. Recife – UFPE, p. 63, 2000.

BUDINSKY, A. et al. Regular ingestion of *Opuntia robusta* lowers oxidation injury. **Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids**. v. 65, n.1, p.45-50, 2001.

BUROW, M.E. et al. Differences in Susceptibility to Tumor Necrosis Factor α -induced Apoptosis among MCF-7 Breast Cancer Cell Variants. **Cancer Research**, v. 58, p. 4940-4946, 1998.

BUTLER, M.S. Reviews: The Role of Natural Product Chemistry in Drug Discovery. **Journal of Natural Products**., v. 6, p. 2141-2153, 2004.

BUTTERWECK, V. et al. Comparative evaluation of two different *Opuntia ficus-indica* extracts for blood sugar lowering effects in rats. **Phytotherapy Research**, v. 25, p. 370–375, 2011.

BWITITI, P.T. et al. Effects of *Opuntia megacantha* leaves extract on renal electrolyte and fluid handling in streptozotocin (STZ)-diabetic rats. **Ren Fail**, v.23, n. 2, p. 149-158, 2001.

CALIXTO, J.B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Braz J Med Biol Res**, v.33, p. 179-189, 2000.

CARDENAS MEDELLIN, M.L.; SERNA SALDIVAR, S.O.; VELAZCO DE LA GARZA, J. Effect of raw and cooked nopal (*Opuntia ficus indica*) ingestion on growth and profile of total cholesterol, lipoproteins, and blood glucose in rat. **Arch Latinoam Nutr**, v. 48, p. 316-323, 1998.

CARLINI, E.A. et al. Treatment of drug dependence with Brazilian herbal medicines. **Rev Bras Farmacogn**, v. 16, p. 690-695. 2006.

CARRARD, V.C. et al. Teste dos Micronúcleos – Um Biomarcador de Dano Genotóxico em Células Descamadas da Mucosa Bucal. **Revista da Faculdade de Odontologia de Porto Alegre**, Porto Alegre, n. 1/3, v. 48, p. 77-81, jan./dez. 2007.

CERQUEIRA, F.M. et al. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441 -449, 2007.

CERUTTI, P.A. Oxy-radicals and cancer. **Lancet**, London, n. 8926, v.344, p.862-863, 1994.

CETTO, A.A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **J. Ethnopharmacol**, v. 99, p.325-348, 2005.

CHEQUER, F.M.D. **Utilização do Teste de Micronúcleo na avaliação da toxicidade dos azos corantes Disperse Red1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13**. 2008. 124f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CHEN, C.Y.; PAN, L.K. Trace elements of Taiwanese dioscorea spp. using instrumental neutron activation analysis. **Food Chemistry**, v. 72, p. 255-260, 2001.

CHORILLI, M., LEONARD, G.R.; SALGADO, H.R.N. Radicais livres e antioxidantes: conceitos fundamentais para aplicação em formulações farmacêuticas e cosméticas. **Rev Bras Farm**; v. 3, p. 113-8. 2007

CHUN, O. K. et al. Daily consumption of phenolics and total antioxidant capacity from fruit and vegetables in the American diet. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n. 10, v. 85, p. 1715-1724, 2005.

CHIACCHIO, F.P.B.; MESQUITA, A.S.; SANTOS, J.R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, n.3, v.7, 2006.

CIAPETTI, G. et al. In vitro testing of the potential for orthopedic bone cements to cause apoptosis of osteoblast-like cells. **Biomaterials**, v. 17, p. 1259-1264, 1996.

CONDE, L. Anatomical comparisons of five species of *Opuntia* (Cactaceae) **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 62, p. 425-473, 1975.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. **Mol Biotechnol**, v. 26, p. 249–261, 2004.

COLLINS, A.R. et al. The comet assay: Topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, n.3, p.143-151, 2008.

CONNOLLY, J.D; HILL, R.A. Triterpenoids. **Nat. Prod. Report**, v. 18, p. 560-578, 2001.

CRUZ, A. S. Teste de citotoxicidade *in vitro* como alternativa ao teste *in vivo* de Draize na avaliação de produtos cosméticos. São Paulo, Tese de doutorado. Universidade de São Paulo, 2003.

CUTTER, E. G. **Anatomia vegetal. Parte II – Órgãos. Experimentos e interpretações** Ed. Rocca, São Paulo, 1987.

DAGUANO, J.K.M.F.; SANTOS, C.; ROGERO, S.O. **Avaliação da citotoxicidade de biocerâmicas desenvolvidas para uso em sistemas de implantes**. MATÉRIA (RIO DE JANEIRO), n.1, v. 12, 2007.

DALLE-DONNE, I. et al. Protein carbonyl groups as biomarkers of oxidative stress. **Clinica Chimica Acta**, n.1-2, v. 329, p. 23–38, 2003.

DESSIMONI, G.V.; BARBOSA, C.D.; DESSIMIONI-PINTO, N.A.V. Composição bromatológica, mineral e fatores antinutricionais da palma forrageira. **Tecnol e Ciên Agropec** v.8, p. 51-55, 2014.

DIAZ, M.N. et al. Antioxidants and atherosclerotic heart disease. **N. Engl. J. Med**, v. 337, p. 408-416, 1997.

DICKISON, W.C. **Integrative Plant Anatomy** Harcout Academic Press, San Diego, 2000.

DOK-GO, H.; LEE, K.H.; KIM, H.J. Neuroprotective effects of antioxidative flavonoids quercetin, (+)-dihydroquercetin and quercetin 3-methyl ether, isolated from *Opuntia ficus-indica* var. *saboten*. **Brain Res.** n.1-2, v. 965, p. 130-136, 2003.

DOUGHARI, J. H.; EL-MAHMOOD, A. M.; TYOYINA, I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L.). **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 22, p. 102–106, 2008.

DUARTE, A.E. et al. Polyphenolic Composition and Evaluation of Antioxidant Activity, Osmotic Fragility and Cytotoxic Effects of *Raphiodon echinus* (Nees & Mart.) Schauer. **Molecules**, v. 21, p. 2-15, 2016.

DUARTE, R.P.S; PASQUAL, A. Avaliação do cádmio (Cd), chumbo (Pb), níquel (Ni) e zinco (Zn) em solos, plantas e cabelos humanos. **Energ Agric**, v. 15, p. 46-58, 2000.

ELISABETSKY, E. **Remédio tem ciência? V Jornada Catarinense e I Jornada Internacional de Plantas Mediciniais. Livro de Resumos.** Joinville, SC, 2006.

ENIGBOKAN, M. et al. Hypoglycemic effects of *Opuntia ficus-indica* Mill. *Opuntia lindheimeri* Engelen and *Opuntia robusta* Wendel in streptozotocin-induced diabetic rats. **Phyto Res**, v. 10, p. 379-382, 1996.

FABELLA-ILLESCAS, H.E. et al. Efecto de una bebida a base de Nopal (*Nopalea cochenillifera*) en pacientes de una población rural de Hidalgo, México; ensaio clínico piloto. **Nutr Hosp** v.32, n. 6, p. 2710-2714, 2015.

FAHN, A. **Plant anatomy** Pergamon Press, Oxford., 1990.

FAVIER, A. **Les oligoéléments en nutrition humaine.** In: CAPPUIS, P. (Ed) Les oligoéléments en médecine et biologie. Paris: Editions médicales Internationales, p. 41-74, 1991.

FELKER, P.; SINGH, G.; PAREEK, O.P. Opportunities for development of cactus (*Opuntia spp.*) in arid and semi-arid regions. **Ann. Arid Zone** v. 36, p. 267–278, 1997

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, n.1-2, v. 455, p. 81–95, 2000.

FERNANDEZ, P.L. et al. Analytical Nutritional and Clinical Methods Section Multi-element analysis of tea beverages by inductively coupled plasma atomic emission spectrometry **Food Chemistry**, v.76, p. 483–489, 2002.

FERNÁNDEZ, M.L.; TREJO, A.; MCNAMARA, D. Pectin Isolated from prickly pear (*Opuntia* sp.) modifies low density lipoprotein metabolism in cholesterol-fed guinea pigs. **Journal of Nutrition**, v. 120, p. 1283–1290, 1990.

FERRARO, M.V.M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos.** 2009. 189 f. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERRAZ, A., et al. Screening for antiproliferative activity of six southern Brazilian species of *Hypericum*. **Phytomedicine**, n. 1-2, v.12, p. 112-115, 2005.

FERREIRA, I.C.F.R. et al. Free-radical scavenging capacity and reducing power of wild edible mushrooms from northeast Portugal. Individual Cap And Stipe Activity, **Food Chem**, v. 100, p.1511-1516, 2007.

FIGUEIREDO, F.R.G. **Ensaio mutagênicos em decocto de *Cochlospermum regium* (Mart. et. Schr.) Pilger (Bixaceae) em *Poecilia reticulata* e linfócitos humanos.** Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde) – Pontífica Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2012.

FLORES-FLORES, V.; TEKELENBURG, A. **Produção de corante dacti (*Dacylopius coccus* Costa).** In: BARBERA, Guiseppa; INGLESE, Paolo (Eds.). Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira. Paraíba: SEBRAE/PB, p.169-186, 2001.

FORT, D.M. et al. Antihyperglycemic activity of *Teramnus labialis* (Fabaceae). **Phytomedicine**, v. 6, p. 465-467, 2000.

FRANKEL, E.N. Lipid oxidation. **Prog. Lip. Res.**, v. 19, p. 1-22, 1980.

FRATI-MUNARI, A.C. et al. Effects of nopal (*Opuntia* sp.) on serum lipids, glycemia and body weight. **Arch Invest Med**. n.14, v.2, p. 117-25, 1983.

FRATI-MUNARI, A.C. et al. Hypoglycemic action of *Opuntia streptacantha* Lemaire: study using raw extracts. **Arch. Invest. Med. (Mex)**, v. 20, p. 321-325, 1989.

FRATI-MUNARI, A.C. et al. Activity of *Opuntia streptacantha* in healthy individuals withinduced hyperglycaemia. **Arch. Invest. Med.** v. 21, p. 99–102, 1990.

FRATI, A.C.; JIMÉNEZ, E.; ARIZA, C. R. Hypoglycemic effect of *Opuntia ficus indica* in non insulin – dependent diabetes mellitus patients. **Phytotherapy**, n. 4, v. 5, p. 195 – 197, 1990.

FRATI, A.C. et al. The effects of two sequential doses of *Opuntia streptacantha* upon glycaemia. **Arch. Invest. Med.**, v. 22, p. 333–336, 1991.

FREITAS, P.S. **Investigação do potencial mutagênico do extrato de frutos de *Vaccinium corybosum* (mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos Swiss *in vivo*.** Dissertação (Mestrado). Universidade Jose do Rosário Vellano, Alfenas/Minas Gerais, 2007.

FLORES VALDEZ, C.A. **Produção, industrialização e comercialização de verdura de palma forrageira.** In: Barbera, Guisepe; Inglese, Paolo (Eds.). Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira. Paraíba: SEBRAE/PB, p. 94-102, 2001.

FENECH, M. The *in vitro* micronucleus technique. **Mutation Research**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. et al. HUMN project: detailed description of the scoring criteria for the cytokinesis-block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. **Mutation Research**, v. 534, p. 65-75, 2003.

FERNANDEZ, K.G. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia férrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciênc Tecnol Aliment** v. 3, p. 751-754, 2010.

GALATI, E.M. et al. Biological effect of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae) waste matter Note I: diuretic activity **Journal of Ethnopharmacology**, v. 79, p. 17–21, 2002.

GANESAN, A. The impact of natural products upon modern drug discovery. **Current opinion in chemical biology**. v. 12, p. 306-317, 2008.

GARCIA, C.M. et al. Estudo morfo-anatômico de *Phyllanthus niruri* L. e *Phyllanthus tenellus* Roxb **Lat. Am. J. Pharm.** n. 23, v.1, p. 67-70, 2004.

GODARD, M. et al. Acute blood glucose lowering effects and long-term safety of OpunDia™ supplementation in pre-diabetic males and females. **Journal of Ethnopharmacology** v. 130, p. 631–634, 2010.

GOMES-FLORES, R. et al. *In vitro* antibacterial and antifungal activities of *Nopalea cochenillifera* pad extracts. **Am. J. Infect. Dis.** n. 2, v.1, p. 1-8, 2006.

GUEZ, C.M. et al. In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Science**, v. 48, p. 461-467, 2012.

GUEZ, C.M. **Avaliação dos efeitos do extrato de manjeriço (*Ocimum basilicum* L.) sobre oxidativo, parâmetros inflamatórios e genotóxicos em leucócitos cultura humana.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), UNIPAMPA, Uruguaiana, 2014.

GUEDES, C.C. **Culinária com broto de palma.** João Pessoa: Universitária, 53p, 2002

GUEDES, C.C. **Broto de palma – sabor e nutrição: livro de receitas.** Recife: SEBRAEPE / FAEPE, 48p, 2004.

GUERRA, P.M.; NODARI, O.R. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos.** In: SIMÕES, M. O. et al. *Farmacognosia: da planta ao medicamento.* 3. ed. Porto Alegre: UFRGS; Florianópolis: UFSC, p.15, 2001.

GUEVARA-FIGUEROA, T. et al. Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.) **Journal of Food Composition and Analysis**; n. 23, p. 525–532, 2010.

GUTTERIDGE, J.; HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants in the year 2000: a historical look to the future. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n.1, v. 899, p. 136-147, 2000.

GÖKTÜRK, N.B.; GÜLCAN, G. O.; YAS, S.A. Evaluation of the antiradical and antioxidant potential of grape extracts. **Food Chemistry**. v. 18, p. 1131–1136, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals, antioxidants, and human disease: curiosity, cause, or consequence? **Lancet**, v. 8924, n. 344, p. 721-724, 1994.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. *Free Radicals in Biology and Medicine*, 3rd Ed, Oxford University Press, NY, 2007.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the *in vivo* alkaline comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, p. 45–51, 2003.

HARRIS, D.C. **Química Analítica quantitativa**. 5ª Ed, Rio de Janeiro: LTC, 2001.

HARVEY, A. Strategies for discovering drugs from previously unexplored natural products. **Drug Discovery Today** v.5, p. 294-300, 2000.

HOLLIS, H.; SCHEINVAR, L. **El interesante mundo de las cactáceas**. México: Fondo de Cultura Económica, 235 p. 1995.

HUNT, D.; TAYLOR N. The genera of Cactaceae - Progress Toward Consensus. **Bradleya** v. 8, p. 85-107, 1990.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes for calcium, phosphorus, magnesium, vitamin D, and fluoride. Washington (DC): National Academy Press, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Academy of Sciences on DRIs for Calcium, Phosphorus, Magnesium, Vitamin D, and Fluoride, 1997.

INSTITUTE OF MEDICINE. National Academy of Sciences on DRIs for Vitamin A, Vitamin K, Arsenic, Boron, Chromium, Copper, Iodine, Iron, Manganese, Molybdenum, Nickel, Silicon, Vanadium, and Zinc, 2000.

INSTITUTE OF MEDICINE . National Academy of Sciences on Dietary Reference Intakes (DRIs) for Water, Potassium, Sodium, Chloride, and Sulfate, 2004.

INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes. Washington (DC): National Academy Press; 2005.

IGNAT, I.; VOLF, I.; POPA, V.I. A critical review of methods for characterisation of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. **Food Chem.**, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.

JACOBOWSKI, A.C. **Avaliação do potencial efeito genotóxico de quelato de cobre nano e microencapsulado.** Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Católica Dom Bosco, Mato Grosso do Sul, 2009.

JOLY, A.B. **Botânica: Introdução à taxonomia vegetal.** 13ª ed. São Paulo, Companhia Editora Nacional, 2002.

JUNQUEIRA, V.B.C., RAMOS, L.R. **Estresse Oxidativo.** In: RAMOS, L. R.; NETO, J. T. Geriatria e Gerontologia. Barueri: Manole Ltda., 2005.

KEYVAN DASTMALCHI, H.J. et al. Chemical composition and in vitro antioxidative activity of a lemon balm (*Melissa officinalis* L.) extract. **LWT**, v. 41, p. 391–400, 2008.

KIM, C.J; LIM, J.S.; CHO S.K. Anti-diabetic agents from medicinal plants inhibitory activity of *Schizonepeta tenuifolia* spikes on the diabetogenesis by streptozotocin in mice. **Arch. Pharmacol Res.** v. 19, p. 441-446, 1996.

KOSHY, A.S.; VIJAYALAKSHMI, R. Impact of certain flavonoids on lipid profiles. Potential action of *Garcinia cambogia* flavonoids. **Phytother. Res.**, v. 15, p. 395-400, 2001.

KRAUSE, M.V.; MAHAN, L.K. **Alimentos, nutrição e dietoterapia.** São Paulo: Livraria Roca. 1991.

LANS, C.A.J. Ethnomedicines used in Trinidad and Tobago for urinary problems and diabetes mellitus. **Ethnobiol Ethnomed.** v. 13, p. 2- 45, 2006.

LAPA, A.J; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.T.R; GODINHO, R.O; NOGUEIRA, T.C.M.L. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. In: Simões CMO, Schenkel EP, Gosmam G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. Farmacognosia: da planta ao medicamento. 6 ed. Porto Alegre: Editora da UFRGS; 2007.

LAURENZ, J.C.; COLLIER, C.C.; KUTI, J.O. Hypoglycaemic effect of *Opuntia lindheimeri* Englem in a diabetic pig model. **Phytother Res.** n.1, v. 17, p. 26-29, 2003.

LEE, E.H. et al. Constituents of the stems and fruits of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. **Arch. Pharm. Res.** v. 26: 1018–1023, 2003.

LEITE, J. P. V. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

LOPES, M.F.G. et al. Estudo mineral de plantas medicinais. **Rev Bras Farmacogn** v.12, p. 115-116, 2002.

LORO, J.F.; DEL RIO, I.; PÉREZ-SANTANA, L. Preliminary studies of analgesic and anti-inflammatory properties of *Opuntia dillenii* aqueous extract. **Journal of Ethnopharmacology** v. 67, p. 213–218, 1999.

LOUIS, K.S.; SIEGEL, A.C. Cell viability analysis using trypan blue: manual and automated methods. **Methods in Molecular Biology**, v. 740, p. 7-12, 2011.

LORENZI, H.; SOUZA, C.V. **Botânica Sistemática**. Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II. Nova Odessa, Instituto Plantarum. São Paulo, 2005.

LUO C. et al. Chemical Composition and Antidiabetic Activity of *Opuntia Milpa Alta* Extracts **Chemistry & Biodiversity**, v. 7, p. 2869-2879, 2010.

MACEDO, A.F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C.F. Occurrence of the use of medicinal plants by residents of a municipality of the district of Marília-SP. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 28, p. 123-128, 2007.

MACHADO, L. **Controle de Qualidade e Atividade Biológica de *Sida rhombifolia* L.** Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2012.

MALHEIROS, C.K.C. **Avaliação Preliminar *in vitro* do potencial antioxidante e da toxicidade de *Ceiba speciosa* (A. St.-Hill) Ravenna (Paineira)**, Dissertação de Mestrado, UNIPAMPA, Pós Graduação em Ciências Farmacêuticas, 2014.

MAIA NETO, A.L. **Cultivo e utilização da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill. e *Nopalea cochenillifera* (Salm Dyck) para produção de leite no semi-árido nordestino**. Salvador: Universidade Federal da Bahia/Escola de Medicina Veterinária/ Departamento de Produção Animal, 40 p, 2000.

MACHADO, H. et al. Flavonoides e seu potencial terapêutico. **Bol. Cent. Biol. Reprod.**, Minas Gerais, v. 26, p. 37, 2008.

MARTINS, A.S. et al. Avaliação de Minerais em plantas medicinais amazônicas. **Rev. Bras. Farmacog.** n.19, v. 2, p. 621-625, Abr./Jun. 2009.

MARQUES, R.C.P. et al. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. **Mutation Research**, v. 536, p. 117-120, 2003.

MACEDO, A.F.; OSHIWA, M.; GUARIDO, C.F. Ocorrência do uso de plantas medicinais por moradores de um bairro do município de Marília-SP. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada**, v. 28, p.123-128, 2007.

MAUSETH, J. Comparative structure-function studies within a single strongly dimorphic species, *Melocactus intortus* (Cactaceae). **Bradleya**, v.7, p. 1-12, 1989.

MAUSETH, J. Anatomical Features, other than wood, in subfamily Opuntioideae (Cactaceae) **Haseltonia**, v. 11, p. 113-125, 2005.

MERSCH, J. BEAUVAIS, M.N; NAGEL, P. Induction of micronucleus in haemocytes and gill cells of zebra mussels, *Dreissena polymorpha*, exposed to clastogens, **Mutation Research**, v. 371, p. 47-55, 1996.

MESQUITA, M.L. **Potencial antitumoral de substâncias isoladas de plantas do Cerrado brasileiro: estudos preliminares do mecanismo de ação da atividade citotóxica.** Tese de Doutorado. Brasília, 2009.

METCALFE, C.; CHALK, L. **Anatomy of the Dicotyledons.** Clarendon Press, Oxford, v. 2, 1950.

MISAWA, E. et al. Administration of phytosterols isolated from Aloe vera gel reduce visceral fat mass and improve hyperglycemia in Zucker diabetic fatty (ZDF) rats **Obesity Res. Clin. Pract.**, v. 2, p 239-245, 2008.

MORABITO, F. et al. Lipid peroxidation and protein oxidation in patients affected by Hodgkin's lymphoma. **Mediators of Inflammation**, v. 13, p 381-383, 2004.

MORRIS, W.; GOMES, S.; ALLEN, M. International classification of traditional medicine. **Global Advances in Health and Medicine**, v. 4, p. 38-41, 2012.

MORRIS, W.; GOMES, S., ALLEN, M. International classification of traditional medicine. **Global Advances in Health and Medicine**, v. 4, n.1, p. 38-41, 2012.

NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH. The Guide for the Care and Use of Laboratory Animal. Washington, D.C.: National Academy Press; 1996.

NECCHI, R.M.M.; ZANETTI, G.D.; MAKI, T.D.T.; ROYER, L.J.; MANFRON, M.P. Morphology and histochemistry of cladodes of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae). **Lat Am J Pharm**, v. 29, p. 422- 427, 2010.

NECCHI, R.M.M.; MAKI, T.D.T.; DO CANTO, G.S.; MORESCO, R.N.; DALMORA, S.L.; MANFRON, M.P. Antiinflammatory activity and biochemical parameters of the ethanol extract of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae) **Lat Am J Pharm**, v.30, p. 786-789, 2011.

NECCHI, R.M.M.; ALVES, I.; ALVES, S.H.; MANFRON, M.P. In vitro antimicrobial activity, total polyphenols and flavonoids contents of *Nopalea cochenillifera* (L.) Salm-Dyck (Cactaceae). **Research in Pharmacy**, p. 01-07, 2012.

NOGUEIRA, D.R.; SANGOI, M.S.; SILVA, L.M.; TODESCHINI, V.; DALMORA, S.L. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. **J Sep Sci**, v. 31, p. 3098-3105, 2008.

MAUSETH, J. Anatomical Features, other than wood, in subfamily Opuntioideae (Cactaceae) **Haseltonia**, v. 11, p. 113-125, 2005.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. **J Nat Prod**. n.3, v. 70, p. 461-77, 2007.

NOGUEIRA, D.R. et al. Determination of rupatadine in pharmaceutical formulation by a validated stability-indicating MEKC method. **J Sep Sci.**, n.16, v.31, p. 3098-105, 2008.

OHKAWA, H.; OHISHI, L.; YAGI, K. Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. **Analytical Biochemistry**, v. 95, p. 351-358, 1979.

OSTLING, O.; JOHANSON, KJ. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 123, p. 291-298, 1984.

PLANELLIS, E. et al. Ability of a Cocoa Product to Prevent Chronic Mg Deficiency in Rats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 45, p. 4017-4022, 1997.

PARK, E.H. et al. An anti-inflammatory principle from cactus. **Phytotherapy**, v. 72, p. 165-167, 2001.

PEREIRA, C.B. et al. Antimicrobial activity and cytotoxicity of the crude extract obtained from *Morus alba* L. (Moraceae) **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 33, p. 133-137, 2012.

PAOLO, C.D. **Aplicação do Ensaio Cometa a estudo de danos ao DNA de robalos, *Centropomus parallelus* (Poey, 1860), expostos à β -naftoflavona.** Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

PARK, E.H. et al. An anti-inflammatory principle from cactus. **Phytotherapy**, v. 72, p. 165-167, 2001.

PÉREZ-MATUTE, P.; ZULET, M.A.; MARTÍNEZ, J.A. Reactive species and diabetes: counteracting oxidative stress to improve health. **Current Opinion in Pharmacology**, n. 9, v. 6, p. 771-779, 2009.

PIETTA, P.G. Flavonoids as Antioxidants. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1035-1042, 2000.

PINTO, N.A.V.D; VILAS BOAS, B.M.; CARVALHO, V.D. Caracterização mineral das folhas de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Cienc e Agrotec** v. 23, p. 57-61, 1999.

PROESTOS, C. et al. RP-HPLC analysis of the phenolic compounds of plant extracts. Investigation of their antioxidant capacity and antimicrobial activity. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 53, p. 1190-1195, 2005.

QIU, Y. et al. Constituents with radical scavenging effect from *Opuntia dillenii*: Structures of new a-Pyrone and flavonol glycoside. **Chemistry and Pharmacology Bulletin**; v. 50, p. 1507-1510, 2002.

REHMAN, S.U.; CHOE, K.; YOO, H.H. Review on a Traditional Herbal Medicine, *Eurycoma longifolia* Jack (Tongkat Ali): Its Traditional Uses, Chemistry, Evidence-Based Pharmacology and Toxicology. **Molecules**, v. 21, p. 331- 341, 2016.

ROY, P.; MUKHERJEE, A.; GIRI, S. Evaluation of genetic damage in tobacco and arsenic exposed population of Southern Assam, India using buccal cytome and comet assay **Ecotoxicol Environ Saf**, v. 124, p. 169–176, 2015.

RAO, A.V.; GURFINKEL, D.M. The bioactivity of saponins: triterpenoid and steroidal glycosides. **Drug Metabol. Drug Interact**,v.17, p. 211-235, 2000.

ROCHA, D.R.C. et al. Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alim Nutr Araraquara**, n. 4, v. 19, p. 459-65, 2008.

ROGERO, S.O. et al. Cytotoxicity due to corrosion of ear piercing studs. **Toxicology in vitro**, n. 6, v. 14, p. 497-504, 2000.

ROSSATO, L.G. **A sinefrina e o seu potencial cardiotoxíco: O uso no emagrecimento e metodologias analíticas para detectar a sinefrina**. Dissertação (Mestrado em Toxicologia Analítica Clínica e Forense) - Universidade do Porto, Porto, 2009.

ROYALL, J.A.; ISCHIROPOULOS H. Evaluation of 2',7'-dichlorofluorescein and dihydrorhodamine 123 as fluorescent probes for intracellular H₂O₂ in cultured endothelial cells. **Arch Biochem Biophys**, n.2, v. 302, May, p. 348-55. 1993.

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.) **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra, 2003.

RUBINSTEIN, L.V. et al. Comparison of in vitro anticancer-drug-screening data generated with a tetrazolium assay versus a protein assay against a diverse panel of human tumor cell lines. **Journal of National Cancer Institute**, v. 82, p. 1113-1118, 1990.

RUTKOWSKA, J. et al. Negative effects of elevated testosterone on female fecundity in zebra finches. **Hormones and Behavior**, v. 47, p. 585– 591, 2005.

SÁENZ HC. Cladodes: A source of dietary fiber. **J. Prof. Assoc. Cactus. Dev.**v. 2, p.117–123, 1997.

SÁNCHEZ-MORENO C. Review: methods used to evaluate the free radical scavenging activity in foods and biological systems. **Food Sci Technol Int**; v.8, p. 121-37, 2002.

SANTOS, M.C.A. et al. Anatomia e histoquímica de folhas e raízes de vinca (*Catharanthus roseus* (L.) G. Don). **Revista de Biologia e Ciência da Terra**, n. 1, v. 8, 2009.

SANTOS MONTAGNER, G.F.F. et al. Toxicological Effects of ultraviolet radiation on lymphocyte cells with different manganese superoxide dismutase Ala16val polymorphism genotypes. **Toxicology In Vitro**, v. 24, p. 1410-1416, 2010.

SENGUL, M. et al. Total phenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of some medicinal plants. **Pak. J. Pharm. Sci.**, n.1, v.22, p.102-106, 2009.

SCHMID, W. The Micronucleus Test. **Mutation Research**, v. 31, p. 09-15, 1975.

SILVA, J.; ERDTMANN B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética Toxicológica**. Porto Alegre: Editora Alcance, 422p, 2003.

SILVA, C. S. et al. Avaliação do uso da casca do fruto e das folhas de *Caesalpinia férrea* Martius como suplemento nutricional de Fe, Mn e Zn. **Ciênc. Tecnol. Aliment.**, n.3, v. 30 , p. 751-754, 2010.

SILVA, C.S. et al. Cocoa and chocolate flavonoids: Implications for cardiovascular health. Journal of the American Dietetic Association. **Journal of the American Dietetic Association**, v.103, p. 215–23, 2003.

SINGH, N. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individuals cells. **Experimental Cell Research**, n. 1,v. 175, p. 184–191, 1995.

SIES, H. Strategies of antioxidant defence. Review. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, n.2, v. 215, p.213- 219, 1993.

SIES, H., STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, n.6, v.62, p.1315-1321, 1995.

SIMIC, M.G., JAVANOVIC, S.V. **Inactivation of oxygen radicals by dietary phenolic compounds in anticarcinogenesis.** *In:* HO, C.T., OSAWA, T., HUANG, T.M., ROSEN, R.T. Ed. Food phytochemicals for cancer prevention. Washington: American Chemical Society, 1994.

SKOOG, D.A.; HOLLER, F.J.; NIEMAN, T.A. **Principles of Instrumental Analysis.** 5^a ed., Saunders College: New York, 1998.

SOARES, M. S. **Estudo do melhoramento do sabor de cacau (*Theobroma cacao* L.) através de ação enzimática durante a fermentação.** Campinas, 2001. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, 2001.

SOFFIATTI, P.; ANGYALOSSY, V. Stem anatomy of *Cipocereus* (Cactaceae). **Bradleya**, v. 21, p. 39-48, 2003.

SOUZA, T.A.; FONTANELLI, C.S. Micronucleus test and observation of nuclear alteration in erythrocytes os *Nile tilapia* exposed to water affect by refinery effluents. **Mutation Research**, v. 605, p. 87-93, 2006.

SHANE-MCWHORTER, L. Botanical dietary supplements and the treatment of diabetes: what is the evidence? **Current Diabetes Reports**, v.5, p. 391–398, 2005.

SOUZA C.V.; LORENZI H. **Botânica Sistemática. Guia ilustrado para identificação das famílias de angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II.** Nova Odessa, Instituto Plantarum. São Paulo, 2005.

SORG, O. Oxidative stress: a theoretical model or biologic reality? **C R Biol**, v. 327, p. 649-662, 2004.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage. **Methods Mol Biol** v. 291, p. 85–95, 2005.

STANIC, G.; SAMARZIJA, L. Diuretic activity of *Satureja montana* subsp. *Montana* extracts and oil in rats. **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 363–366, 1993.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Free radical-mediated oxidation of free amino acids and amino acid residues in proteins, **Amino Acids**, n. 25, v.3, p. 207-218, 2003.

STADTMAN, E.R.; LEVINE, R.L. Protein oxidation. **Annals of the New York Academy of Sciences**, n.1, v. 899, p. 191-208, 2006.

STINTZING, F.C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Phytochemical and nutritional significance of cactus pear. **Eur Food Res Technol**, v. 212, p. 396-407, 2001.

STINTZING, F.C.; CARLE, R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. **Molecular Nutrition and Food Research**, v. 49, p. 175-194, 2005.

STODDART, M.J. Cell viability assays: Introduction. **Methods Mol Biol**, v. 740, p. 1–6, 2011.

TERRAZAS, T.; MAUSETH, J.D. Stem anatomy and morphology. California University Press, Berkeley, p. 47-60, 2002.

TICE, R.R. et al. Single cell gel/Comet Assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.** v.35, p. 206-21, 2000.

TINKEL, J.; HASSANAIN, H.; KHOURI, S. J. Cardiovascular Antioxidant Therapy: A Review of Supplements, **Pharmacotherapies, and Mechanisms**. *Cardiology in Review*, n. 2, v. 20, p. 77-83, 2012.

TOUR 'E, A.; XUEMING, X. Flaxseed lignans: source, biosynthesis, metabolism, antioxidant activity, bio-active components and health benefits. *Comprehensive Reviews in Food, Science and Food Safety*, v. 9, p. 261- 269, 2010.

TREJO-GONZALEZ A. et al. A purified extract from prickly pear cactus (*Opuntia fuliginosa*) controls experimentally induced diabetes in rats. **J Ethnopharmacol.** v. 55, p. 27–33,1996.

TSANG, A.H.K.; CHUNG, K.K.K. Oxidative and nitrosative stress in Parkinson's disease. **Biochimica Et Biophysica Acta**, n.7, v. 1792, p. 643-650, 2009.

URSO, M.L; CLARKSON, P.M. Oxidative stress, exercise, and antioxidante supplementation. **Toxicology**, n. 1, v. 189, p. 41-54, 2003.

VALENTIN-SEVERIN, I.L.E. et al. Use of HepG2 cell line for direct and indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, p. 79- 90, 2003.

VEIGA JUNIOR, V.F. Study of the medicinal plants consumption in the Middle-North Region of the Rio de Janeiro State: acceptance by health professionals, way of use of the population. **Braz J Pharmacog**, v.18, p. 308-313, 2008.

VALENTIN-SEVERIN, I. et al. Use of HepG2 cell line for direct and indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. **Mutation Research**, v. 536, p. 79- 90, 2003.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, n.1, v.39, 44-84, 2007.

WAN-IBRAHIMA, W.I.; SIDIK, K.; KUPPUSAMYA, U.R. A high antioxidant level in edible plants is associated with genotoxic properties. **Food Chemistry**. v.122, p. 1139–1144, 2010.

WELZ, B; SPERLING, M. Atomic Absorption Spectrometry 3^a ed. Germany; Willey-VCH, 1999.

WILKING, M. et al. Circadian rhythm connections to oxidative stress: implications for human health. **Antioxidants and Redox Signaling**, n. 10; v. 19, 192–208., 2012.

WORD HEALTH ORGANIZATION (WHO) Trace Elements in Human Nutrition and Health. Geneva, 1996.

WU, X.J.; HANSEN, C. Antioxidant Capacity, Phenolic Content, and Polysaccharide Content of *Lentinus edodes* Grown in Whey Permeate-Based Submerged Culture , **J Food Sci**, n.1, v. 73, p. 1-8, 2008

YOSHIKAWA, M. et al. Medicinal flowers. Marigold. Hypoglycemic, gastric emptying inhibitory and gastroprotective principles and new oleanano-type, triterpene oligoglycosides, calendasaponins A, B, C, and D, from Egyptian *Calendula officinalis*. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 49, p. 863-870, 2001.

YU, T.W.; ANDERSON, D. Reactive oxygen species-induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, n. 2, v. 379, p. 201-210, 1997.