

---

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR)**

---

**TOXICOGENÉTICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,  
ANTIMICROBIANA E CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO  
E MICROBIOLÓGICO DO NUTRACÊUTICO CACTI-NEA <sup>TM</sup>**

**FERNANDA FLORES NAVARRO**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**Rio Claro - SP  
Agosto - 2018**



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**  
**“JÚLIO DE MESQUITA FILHO”**  
**INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS – RIO CLARO**



**TOXICOGENÉTICA, AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIOXIDANTE,  
ANTIMICROBIANA E CONTROLE DE QUALIDADE FÍSICO-QUÍMICO  
E MICROBIOLÓGICO DO NUTRACÊUTICO CACTI-NEA <sup>TM</sup>**

Tese apresentada ao Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas.

**FERNANDA FLORES NAVARRO**

**Orientadora: Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES**

**Agosto - 2018**

N322t

Navarro, Fernanda Flores

Toxicogenética, avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e controle de qualidade físico-químico e microbiológico do nutracêutico Cacti-Nea <sup>TM</sup> / Fernanda Flores Navarro. -- Rio Claro, 2018

129 p.

Tese (doutorado) - Universidade Estadual Paulista (Unesp), Instituto de Biociências, Rio Claro

Orientadora: Maria Aparecida Marin Morales

1. Nutracêutico. 2. Citotoxicidade. 3. Genotoxicidade. 4. Mutagenicidade. 5. Opuntia ficus-indica. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca do Instituto de Biociências, Rio Claro. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.



CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA TESE: Toxigenômica, avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e controle de qualidade físico-químico e microbiológico do nutracêutico Cacti-Nea™

AUTORA: FERNANDA FLORES NAVARRO

ORIENTADORA: MARIA APARECIDA MARIN MORALES

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR), pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. MARIA APARECIDA MARIN MORALES  
Departamento de Biologia / Instituto de Biociências de Rio Claro / SP

Prof. Dr. MATHEUS MANTUANELLI ROBERTO  
UNIARARAS / Fundação Hermínio Ometto - Araras / SP

Prof. Dr. ARMINDO ANTONIO ALVES  
Centro Universitário Herminio Ometto de Araras / Nucisa Nucleo de Ciências da Saúde - Araras/SP

Profa. Dra. DANIELE MICHELIN PAGANOTTI  
Instituto de Ciências da Saúde / UNIP - Universidade Paulista - Limeira/SP

Profa. Dra. THAÍS CRISTINA CASIMIRO FERNANDES  
FAM / Faculdade de Americana - SP

Rio Claro, 17 de agosto de 2018

Título alterado para: "Toxicogenética, avaliação da atividade antioxidante, antimicrobiana e controle de qualidade físico-químico e microbiológico do nutracêutico Cacti-nea™"

*A você minha pequena Isabela,  
minha luz, meu porto seguro.*

*Amo você*

## **Agradecimentos**

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP), campus de Rio Claro/SP, junto ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Biologia Celular e Molecular), por cederem a estrutura necessária para a realização de todo o trabalho.

À Fundação Hermínio Ometto “UNIARARAS” pelo apoio e disponibilização da infraestrutura para realização de parte deste trabalho.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Aparecida Marin Morales, por todas as oportunidades, aprendizado, ensinamentos e conselhos valiosos. Muito obrigada por ser minha orientadora e exemplo de profissional e ser humano.

Aos colegas do laboratório de Mutagênese Ambiental pela convivência, disponibilidade em ajudar e pelos momentos de descontração e risadas. Deixo aqui meus agradecimentos especiais à Adriana, Franco, Raphael, Letícia Gonçalves, Matheus, Cleiton, Cintya e Ana Matraca pelos preciosos ensinamentos e pela companhia nos congressos.

Aos meus pais Roberto e Sandra que sempre me incentivaram e auxiliaram na minha rotina insana para que eu conseguisse realizar este trabalho. À você Jú *in memoriam* que me ensinou a lutar sempre e nunca desistir.

Aos meus sogros, Izildinha e Wagner pelo apoio e auxílio.

À minha pequena grande Isabela, que ao longo destes quatro anos, cresceu, deixou de ser um bebê e tornou-se um linda criança que sorri com o olhar.

À você Wagner, companheiro desta caminhada, obrigada pelo apoio e paciência, muitas foram as dificuldades, mas você permaneceu ao meu lado, muito obrigada.

Aos meus amigos Paula e Thiago, pelo apoio e ajuda nos momentos de maior aflição.

As minhas amigas “manas” Maíra e Flávia, sem o apoio de vocês seria impossível conseguir.

À safra de doutorandos da FHO, Flávia, Fernando, Hércules, nós nos apoiamos mutuamente e nos dividimos entre trabalho e pesquisa.

Aos colegas e professores e coordenadores da FHO – UNIARARAS, por acreditarem em meus passos, permitirem minhas pesquisas e estudos, este trabalho não seria viável

sem seu apoio. Em especial ao coordenador do curso de farmácia, Prof Dr. Ismar Rodrigues, obrigada pela confiança e por sempre me incentivar a crescer.

Aos todos vocês, dizer obrigado é muito pouco frente a tudo que vivemos ao longo deste trabalho, a vida é muito mais leve quando compartilhada com vocês.

*“A alegria não chega apenas no encontro do achado, mas faz parte do processo da busca. E ensinar e aprender não pode dar-se fora da procura, fora da boniteza e da alegria.*

Paulo Freire

## RESUMO

A Cacti-Nea™, um desidratado de extrato aquoso dos frutos da Cactaceae *Opuntia ficus indica*, é um nutracêutico com propriedades diuréticas e antioxidantes, especialmente indicado para o controle de peso corpóreo e proteção celular contra danos oxidativos ocasionados por radicais livres. Diante do alto consumo e das poucas informações de toxicidade do produto, este estudo teve como objetivo avaliar, as atividades antimicrobiana, antioxidante e toxicogenética, assim como realizar testes de controle de qualidade do nutracêutico. A atividade antimicrobiana foi realizada pela técnica de difusão em discos, a atividade antioxidante pelas taxas de viabilidade de leveduras e as técnicas de controle de qualidade pelas metodologias preconizadas pela Farmacopeia Brasileira. A avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos foi feita pelo ensaio de aberrações cromossômicas e do micronúcleo em células meristemáticas de *A. cepa*. A partir do cultivo celular HepG2, foram realizados os ensaios de MTT, ensaio cometa, ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese, índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) e estresse oxidativo (SOD, GST, GSH e TBARS). Os resultados indicam que a concentração de 0,008 g/mL de Cacti-Nea™ apresentou ação antimicrobiana eficiente para *Escherichia coli* e *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* e *Staphylococcus aureus* e nula para *Aspergillus brasiliensis* e *Propionibacterium* sp, sendo que a concentração de 0,008 g/mL foi a mais efetiva para esta ação. O controle de qualidade físico-químico e microbiológico apresentaram resultados dentro do preconizado pelo fabricante e pela Farmacopéia Brasileira. Os achados fitoquímicos indicam presença de flavonoides, saponinas e taninos, 614,4 mg de polifenóis totais e atividade antioxidante para todas as concentrações avaliadas. Diversas concentrações apresentaram inibição na germinação das sementes de *A. cepa*. As concentrações 0,008; 0,006; 0,004 e 0,002 g/mL apresentaram diminuição na divisão celular. Somente a concentração de 0,002 g/mL apresentou potencial mutagênico, dado corroborado pela avaliação de danos nas células F1 deste organismo - teste. Os resultados com a linhagem celular HepG2 indicam que as concentrações avaliadas não apresentaram potencial genotóxico e mutagênico, porém as concentrações avaliadas mostraram um padrão dose-dependente para as concentrações de betalaínas e diminuição da proliferação celular. As concentrações estudadas não apresentaram dano derivado do estresse oxidativo, contudo observou-se um aumento da concentração do sistema enzimático GST, indicando a provável via metabólica do nutracêutico. Infere-se que os dados obtidos indicam um potencial efeito anticarcinogênico para este nutracêutico. Os estudos realizados com a Cacti-Nea™ evidenciaram potenciais terapêuticos para este nutracêutico, indicando que ele pode ser utilizado tanto na reversão de processo de alta proliferação celular (como tumores benígnos e malignos), quanto como agentes antimicrobianos e antioxidantes. Contudo, para a comprovação destas ações, há necessidade de realização de mais estudos com esse nutracêutico, tanto em testes *in vivo* como *in vitro*, pois há evidências também que esse produto altera os níveis de uma importante enzima envolvida na metabolização de xenobiontes (GST).

**Palavras-chave:** *Opuntia ficus indica*, genotoxicidade, mutagenicidade, alimento funcional, qualidade.

## ABSTRACT

Cacti-Nea™, a dehydrated aqueous extract of fruits of *Cactaceae Opuntia ficus indica*, is a nutraceutical with diuretic and antioxidant properties, especially indicated for the control of corporal weight and cellular protection against oxidative damages caused by free radicals. In view of the high consumption and the low toxicity information of the product, this study aimed to evaluate, antimicrobial, antioxidant and toxicogenic activities, besides perform nutraceutical quality control tests. The antimicrobial activity was performed by disc diffusion technique, antioxidant activity by yeast viability rates and quality control techniques by the methods recommended by the Brazilian Pharmacopoeia. The evaluation of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic effects was carried out by the chromosomal and micronucleus aberrations assay in meristematic cells of *A. cepa*. From the HepG2 cell culture, MTT assay, comet assay, micronucleus assay with cytokinesis block, Cytokinesis Block Proliferation Index and oxidative stress (SOD, GST, GSH and TBARS) were performed. The results indicate that the concentration of 0.008 g/mL of Cacti-Nea™ presented an efficient antimicrobial action for *Escherichia coli* and *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* and zero for *Aspergillus brasiliensis* and *Propionibacterium sp.* The physical-chemical and microbiological quality control presented results within the recommended by the Brazilian manufacturer and Pharmacopoeia. The phytochemical findings indicate the presence of flavonoids, saponins and tannins, 614.4 mg of total polyphenols and antioxidant activity for all the concentrations evaluated. Several concentrations showed inhibition in the germination of *A. cepa* seeds. The concentrations 0.008; 0.006; 0.004 and 0.002 g/mL showed decrease in cell division. Only the concentration of 0.002 g / mL showed mutagenic potential, as corroborated by the evaluation of F1 cell damage in this test organism. The results with the HepG2 cell line indicated that the concentrations evaluated did not present genotoxic and mutagenic potential, but the concentrations evaluated showed a dose-dependent pattern for betalain concentrations and decreased cell proliferation. The concentrations studied did not present damage derived from oxidative stress, however an increase in the concentration of the GST enzymatic system was observed, indicating the probable metabolic pathway of the nutraceutical. It is inferred that the data obtained indicate a potential anticarcinogenic effect for this nutraceutical. The studies carried out with Cacti-Nea™ showed therapeutic potentials for this nutraceuticals, indicating that it can be used both in the reversion of the process of high cell proliferation (such as benign tumors and malignant), as well as antimicrobial agents and antioxidants. However, to prove these actions, there is a need for further studies with this nutraceutical, both in *in vivo* and *in vitro tests*, as there is evidence that this product alters the levels of an important enzyme involved in the metabolism of xenobiotics (GST).

**Key words:** *Opuntia ficus indica*, genotoxicity, mutagenicity, functional food, quality.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Atividade antimicrobiana das diferentes concentrações de Cacti-Nea™ frente as cepas avaliadas.....	46
Tabela 2: Atividade antioxidante das soluções de Cacti-Nea™ em células de levedura.....	47
Tabela 3: Análises de controle de qualidade do nutracêutico Cacti-Nea™.....	48
Tabela 4: Controle de qualidade microbiológica da Cacti-Nea™.....	49
Tabela 5: Resultados obtidos pelos testes destinados à caracterização fitoquímica do extrato de <i>Opuntia ficus-indica</i> , na forma comercial Cacti-Nea™.....	65
Tabela 6: Taxa de germinação de sementes de <i>Allium cepa</i> expostas às diferentes concentrações de Cacti-Nea™.....	67
Tabela 7: Frequência e desvios padrão das alterações cromossômicas e nucleares observadas em meristemas radiculares de <i>Allium cepa</i> expostos em diferentes concentrações de Cacti-Nea™.....	69
Tabela 8: Concentração Total de batalaínas, betaxantinas e betacianinas.....	88
Tabela 9: Viabilidade celular (MTT), de células HepG2 expostas a diferentes concentrações de Cacti-Nea™.....	88
Tabela 10: Resultados do ensaio do cometa, realizado com células HepG2, após exposição a diferentes concentrações de Cacti-Nea™.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Aberrações Cromossômicas
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection
BPF	Boas Práticas de Fabricação
CDNB	1 -Cloro - 2,4 - dinitrobenzeno
CN	Controle negativo
CP	Controle positivo
DCNT	Doenças Crônicas não transmissíveis
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DTNB	5-5'-dithiobis - 2- ácido nitrobenzóico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
EO	Estresse oxidativo
ERs	Espécies reativas de oxigênio
ERs	Espécies reativas
FRAME	The Fund of the Replacement of Animals in Medical Experiments
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transfersase
HepG2	Cultivo celular de Hepatoma humano
ICit	Índice de citotoxicidade
IGen	Índice de genotoxicidade
IM	Índice mitótico
IMut – F1	Índice de mutagenicidade na região F1
IMut	Índice de mutagenicidade

IPBC	Índice de proliferação com bloqueio de citocinese
ITox	Índice de toxicidade
MEM	Meio Essencial Mínimo
MO	Microrganismo
MMS	Metil metanosulfonato
MN	Micronúcleo
MNBC	Ensaio de Micronúcleo com bloqueio de citocinese
MTT	Brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolina
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development
PBS	Tampão fosfato-salino
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
SOD	Enzima superóxido dismutase
TBARS	Substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
TRIS	Tris-hidroximetilaminometano
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
UNEP	Programa Ambiental das Nações Unidas
USEPA	United State Environmental Protection Agency
WHO/OMS	Organização Mundial da Saúde

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2 OBJETIVOS.....</b>	<b>17</b>
<b>3 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>18</b>
3.1 Alimento funcional.....	18
3.2 Nutracêutico.....	20
3.3 <i>Opuntia ficus indica</i> .....	21
3.4 Cacti-Nea™.....	23
3.5 Controle de Qualidade.....	24
3.6 Ensaio <i>Toxicológicos</i> .....	26
3.6.1 Testes Genotoxicidade.....	28
3.6.2 Organismo teste <i>A. cepa</i> .....	28
3.6.3 Cultivo celular.....	30
3.6.4 Teste do cometa.....	31
3.6.5 Teste do Micronúcleo.....	32
3.6.6 Estresse oxidativos.....	33
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>36</b>
<b>5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>39</b>
5.1 Artigo: Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante em células da levedura <i>Saccharomyces cerevisiae</i> e controle de qualidade da Cacti-Nea™.....	39
5.2 Artigo: Avaliação do potencial toxicogenético do nutracêutico Cacti-Nea™, por meio de bioensaios com <i>Allium cepa</i> .....	57
5.3 Artigo: Avaliação <i>in vitro</i> dos efeitos toxicogenéticos do nutracêutico Cacti-Nea™ em cultivo celular.....	76
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>102</b>
<b>7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais e nutracêuticos têm despertado a atenção tanto dos profissionais da área de saúde como da população em geral, pelo potencial terapêutico que apresentam. Neste contexto, frutos de algumas espécies de cactos mostram-se candidatos promissores para este fim, devido à composição, principalmente, de minerais, fibras e compostos antioxidantes que possuem (PATEL, 2013).

Os nutracêuticos podem ser definidos como produtos elaborados à partir de um alimento, porém vendidos em formulações farmacêuticas, que apresentam benefícios contra diversas patologias (MAZZA, 2000, HUNGENHOLTZ; SMID, 2002). Tais produtos podem variar de nutrientes isolados, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente modificados, alimentos funcionais e até espécies vegetais (ANUNCIATO, 2011).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulador e fiscalizador de medicamentos, cosméticos e alimentos, inclui os nutracêuticos na categoria de alimentos com propriedades funcionais. De acordo com as Resoluções nº 18 e 19 de 1999, a “propriedade funcional” de um alimento está relacionada ao seu efeito sobre o metabolismo e fisiologia, sendo ele nutriente ou não, por interferir no crescimento, desenvolvimento, manutenção e/ou em outras funções normais do organismo humano. Já o termo “propriedade de saúde” de um agente está relacionado com uma propriedade que afirma, sugere ou implica a existência de uma relação entre o alimento, ou ingrediente, com uma doença ou com uma condição específica relacionada à saúde (BRASIL, 1999).

Devido a esta legislação muito ampla, existem dificuldades na regulamentação destes termos, pois não existe uma caracterização que defina os produtos que são consumidos como alimentos (funcionais), daqueles consumidos como componente isolados, que são vendidos na forma de barra, cápsula ou pó (nutracêuticos). De acordo com Pimentel et al.(2005) e Colla e Moraes (2006), a diferenciação entre essas duas categorias seria de extrema importância para o estabelecimento de limites de consumo de tais compostos.

Diversas espécies vegetais têm sido estudadas para se avaliar e comprovar as suas propriedades como nutracêutico. A espécie *Opuntia ficus indica*, uma planta da

família *Cactaceae* de origem mexicana, popularmente conhecida como figueira da Índia, é utilizada como alimento e também na medicina popular (STINTZING; CARLE, 2005; MILLER, 2007; LEO et al., 2010). Por ser uma planta de região tropical ou subtropical, é encontrada em regiões áridas e semiáridas da América Central e Sul, Austrália, África do Sul e países Mediterrâneos (LEO et al., 2010), sendo altamente adaptada a esses ambientes xeromórficos (BARBERA, INGLESE e PIMIENTA, 1999; GALATI et al., 2001; ENNOURI et al., 2006).

O uso de seus frutos é indicado, na medicina popular, para a redução dos níveis de colesterol e pressão arterial; dores reumáticas e musculares; tratamentos de úlceras, fadiga, debilidade hepática, afecções orais, psoríase, edema, conjuntivites; atividade cicatrizante e anti-inflamatória, além de também serem usados em formulações cosméticas e na fabricação de ração animal (GALATI et al., 2001; VALENTE, et al., 2010).

Ao utilizar alimentos funcionais e nutracêuticos para prevenção e/ou tratamento, são necessários estudos que certifiquem os efeitos terapêuticos dos mesmos. Nesse aspecto, são necessários requisitos que garantam a autenticidade da espécie vegetal utilizada, como a identificação correta da espécie, além da pureza do material, do tipo de plantio e colheita, a avaliação de seus princípios ativos, o preparo do produto a ser consumido e como ele será comercializado. Também devem ser considerados diversos fatores que garantam a qualidade desse material vegetal, como os seus aspectos físicos, químicos, físico-químicos e microbiológicos. Para garantir a qualidade, é importante obedecer as especificações estabelecidas nas Farmacopeias, Códigos Oficiais e Literaturas científicas (ZARONI et al., 2004; MIGLIATO et al., 2007; MICHELIN et al., 2010).

A empresa francesa Bio Serae Laboratories desenvolveu, a partir dos frutos de *Opuntia ficus indica*, um nutracêutico denominado Cacti-Nea™ que apresenta propriedades diuréticas e antioxidantes, especialmente indicado para o controle de peso corpóreo e proteção celular contra danos oxidativos ocasionados por espécies reativas, que pode ser consumido em cápsulas ou em sachês (GALENA, 2006). Este nutracêutico é caracterizado como um desidratado de extrato aquoso de frutos de *Opuntia ficus indica*,

cujo processo de obtenção do pó preserva as características nutricionais e as propriedades funcionais do fruto (BISSON et al., 2010).

Como já citado, inúmeras espécies vegetais são utilizadas na prevenção e no combate à doenças, embora sejam escassos os estudos que comprovem a segurança de utilização das mesmas, principalmente em usos sub-crônicos e crônicos. Diversos autores já evidenciaram ações citotóxicas e genotóxicas de compostos vegetais, que podem estar associadas ao desenvolvimento de tumores (AMES, 1983; ELGORASHI et al., 2003; SIMÕES et al., 2007).

O sistema-teste *Allium cepa* é recomendado para avaliações toxicológicas e tem sido validado pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pelo Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (USEPA) (MAURO et al., 2014). O referido bioindicador é utilizado e aceito para o estudo da toxicidade de plantas medicinais, sendo as alterações no ciclo celular e as alterações cromossômicas das células de meristemas radiculares, as mais indicadas pra avaliar os efeitos adversos e alertar a população sobre a segurança de consumo de certos produtos (VICENTINI et al., 2001).

As mutações no DNA têm provocado diversas doenças, dentre as quais pode-se citar as degenerativas e o câncer. Tais alterações podem ser induzidas por diversos fatores, entre eles os compostos presentes nos alimentos ou em suplementos alimentares (DE ALMEIDA et al., 2005).

Diversos xenobióticos são metabolizados pelo fígado, originando metabólitos potencialmente reativos com a molécula do DNA. O uso de ensaios desenvolvidos com linhagens celulares portadoras de enzimas metabolizadoras endógenas se caracterizam em eficientes indicadores de efeitos danosos que esses compostos possam desencadear nos organismos. A linhagem celular de hepatoma humano (HepG2) se caracteriza como um material biológico promissor para este propósito, pois essas células possuem enzimas de fase I e II, imprescindíveis para ativação e detoxificação de compostos tóxicos (UHL; HELMA; KNASMULLER, 2000).

Para avaliar o potencial de ação de agentes clastogênicos (indutores de quebras cromossômicas) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica

anormal), é indicado o uso do ensaio de micronúcleo (MN). O ensaio do MN em células mantidas em cultura é internacionalmente aceito como parte dos testes recomendados para a avaliação do potencial mutagênico de um composto e para o registro de novos produtos químicos, que entram anualmente no mercado mundial (SBMCTA, 2004). Contudo, esse ensaio deve ser aplicado não só para os produtos derivados da indústria química, mas também para alguns vegetais que possuem compostos com potencial mutagênico. Por isso, os vegetais usados para fins terapêuticos também devem passar por testes credenciados e eficazes para detectar os seus possíveis efeitos mutagênicos, como o teste do MN e do cometa (DE ALMEIDA et al., 2005).

Uma outra análise que vem sendo indicada para avaliar efeitos de compostos químicos de diversas origens é a de estresse oxidativo (EO). O estresse oxidativo é definido como processo onde a formação de espécies reativas (ERs) excede, significativamente, a capacidade de defesa antioxidante e de reparo do organismo (SIES, 1985), tendo como consequência o aumento de danos nas suas biomoléculas (DNA, lipídios, proteínas). Tais danos, quando não corrigidos, comprometem o funcionamento da célula, contribuindo para os processos de envelhecimento, morte celular por apoptose ou necrose e desenvolvimento de doenças (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; MARQUES; MARREIRO, 2006).

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

A proposta deste estudo foi avaliar o potencial toxigenético, antioxidante, e antimicrobiano, bem como a qualidade físico-química e microbiológica do nutracêutico Cacti-Nea™, utilizando diferentes bioensaios realizados com diferentes organismos testes.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a qualidade físico-química e microbiológica do nutracêutico, por meio de ensaios padronizados pela da farmacopeia brasileira;
- Realizar ensaios fitoquímicos, para caracterização da composição química do nutracêutico Cacti-Nea™;
- Avaliar a atividade antioxidante do nutracêutico Cacti-Nea™, por meio dos ensaios com DPPH e de viabilidade celular, realizado com a leveduras *Saccharomyces cerevisiae*;
- Avaliar a atividade antimicrobiana do nutracêutico Cacti-Nea™, pela técnica de difusão de disco realizado com diversas espécies de bactérias e fungos;
- Avaliar o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico do nutracêutico Cacti-Nea™, por meio de testes realizados com o organismo *Allium cepa*;
- Avaliar o potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico do nutracêutico Cacti-Nea™, por meio do ensaio realizados com a linhagem celular humana HepG2;
- Verificar o potencial do risco de indução de estresse oxidativo pela Cacti-Nea™, por meio de ensaios realizados com a linhagem celular humana HepG2.

### 3 REVISÃO DE LITERATURA

#### 3.1 Alimento funcional

A definição de alimentos funcionais surgiu na década de 80 no Japão, por um programa do governo que teve como objetivo o desenvolvimento de novos alimentos saudáveis, voltado à população que envelhecia e ao aumento da expectativa de vida daquele país (ARAI, 1996; HASLER, 2002; ARAY; LUTZ, 2003; SOUZA, 2008). Porém, a preocupação de grande parte da população humana, hoje, é quanto à ingestão de alimentos que contenham todos os nutrientes necessários à saúde e que, conseqüentemente, ofereçam um bem-estar físico e equilíbrio emocional, além de prevenir distúrbios da saúde e auxiliar no tratamento de doenças (MORAES; COLLA, 2008).

Algumas instituições internacionais ligadas à área da saúde definem “alimentos funcionais” como alimentos que fazem parte da nutrição básica de uma população, mas, por apresentarem substâncias biologicamente ativas, também proporcionam benefícios adicionais à saúde de seus consumidores (HASLER et al., 2004). No Brasil, o setor de alimentos é regulamentado pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (<http://www.anvisa.gov.br/>), embora outros órgãos públicos como Ministério da Agricultura (<http://www.agricultura.gov.br/>), também possuam regulamentos para este setor. A portaria nº398 de 30/04/99, da Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde do Brasil (BRASIL, 1999b) define como alimento funcional “Todo alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produz efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica”.

As diretrizes estabelecidas para a classe de alimentos funcionais determinam que os mesmos devem atuar sobre o processo fisiológico do crescimento, desenvolvimento e funções do organismo e/ou manter a saúde geral e reduzir riscos de doenças ao seu consumidor (MORAES; COLLA, 2008).

Além dos alimentos naturais, que apresentam compostos bioativos, os que foram modificados, enriquecidos com nutrientes ou aumentados com fitoquímicos, também se enquadram no âmbito dos funcionais. Alguns autores observaram que os alimentos funcionais apresentam capacidade de regular funções corporais, de forma a auxiliar na proteção contra doenças como hipertensão, diabetes, câncer, osteoporose e

coronariopatias (SOUZA, *et al.*, 2003; MORAES e COLLA, 2006) e de reduzir riscos de doenças crônico-degenerativas (ANJO, 2004; WALZEM, 2004).

A Resolução da Diretoria Colegiada/ANVISA (RDC) nº 2/2002 estabelece as diretrizes a serem adotadas para a avaliação de segurança, registro e comercialização de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde, apresentadas como formas farmacêuticas de cápsulas, comprimidos, tabletes, pós, granulados, pastilhas, suspensões e soluções. Os produtos bioativos são classificados em carotenoides, fitoesteróis, flavonoides, fosfolípidos, organossulfurados, polifenóis e probióticos. Os alimentos novos e novos ingredientes importados ou produzidos no Brasil, devem ser registrados, obrigatoriamente, junto à ANVISA. Mesmo para os produtos de origem animal, de competência do Ministério da Agricultura, o processo referente à comprovação das alegações funcionais deve ser encaminhado, pelo referido Ministério, para a análise da ANVISA (BRASIL, 2002).

A aprovação das solicitações que afirmam ou sugerem a existência de uma relação positiva entre o consumo de determinado alimento ou seu constituinte e a saúde, deve estar vinculada ao atendimento das diretrizes básicas que comprovem as propriedades funcionais ou de saúde estabelecidas na Resolução n. 231, de 03 de dezembro de 1999. Além da segurança do alimento, as diretrizes também estabelece que as solicitações sejam comprovadas cientificamente que não induzam nenhum engano ao consumidor (BRASIL, 1999a). A comprovação da alegação de propriedades funcionais e ou de saúde deve ainda ser conduzida com base em consumo previsto ou recomendado pelo fabricante; finalidade, condição de uso e valor nutricional, quando for o caso, e evidências científicas. São aplicáveis como evidências científicas a composição química, sem caracterização molecular ou formulação do produto; resultados de ensaios bioquímicos, nutricionais e/ou fisiológicos e/ou toxicológicos, avaliados em testes com animais de experimentação; estudos epidemiológicos; ensaios clínicos; evidências abrangentes da literatura científica, comprovações registradas por organizações internacionais de saúde e por legislação internacionalmente reconhecida; e comprovação de ausência de efeitos prejudiciais à saúde, quando consumido, tradicionalmente, pela população (BRASIL, 1999b).

### 3.2 Nutracêutico

Os hábitos alimentares, bem como o estilo de vida mundial, após a globalização, expõem o homem a uma gama de fatores de risco a doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Dentre esses fatores de risco está o consumo de dietas desequilibradas (alto consumo de gorduras saturadas e gorduras *trans*, bem como de açúcares simples), além de uma vida estressante e sedentária, que pode agravar as condições de saúde, se associada ao tabagismo e etilismo. Isso leva a uma mudança no perfil epidemiológico dos países, onde se observa um número crescente de doenças como a obesidade, diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares aterotrombóticas, osteoporose e vários tipos de cânceres. Todo esse quadro de agravamento à saúde, tem levado a população buscar por tratamentos não convencionais, como os baseados nos nutracêuticos (WHO, 2003).

Os nutracêuticos são ricos em compostos fitoquímicos, que podem ser definidos como compostos derivados do metabolismo secundários dos vegetais, encontrados em frutas e hortaliças, que podem ser ingeridos diariamente e apresentar potencial para modificar o metabolismo de maneira favorável à prevenção de diversas patologias (AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION, 2004).

Considerando que a legislação brasileira não apresenta descrições específicas para nutracêuticos e alimentos funcionais, torna-se difícil estabelecer uma regulamentação consistente para os produtos comercializados como nutracêuticos (MILNER, 2004). De acordo com alguns autores (PIMENTEL et al.; 2005, COLLA; MORAES, 2006), o estabelecimento de padrões específicos de qualidade, segurança e eficácia para este tipo de composto seria de extrema importância, pois padronizaria limites de seu consumo. Devido a isso, é de extrema importância que sejam revistas as recomendações diárias dos nutracêuticos, pois o consumo exacerbado de qualquer composto bioativo pode provocar efeitos adversos ao consumidor. Uma outra preocupação seria também quanto aos segmentos mais vulneráveis da sociedade (MILNER, 2004), tais como os idosos, gestantes e lactantes, crianças e imunodeprimidos.

De acordo com Andlauer e Furts (2002), os nutracêuticos podem ser classificados como compostos ricos em fibras dietéticas, ácidos graxos poli-insaturados, proteínas, peptídios, aminoácidos ou cetoácidos, minerais, vitaminas e outros compostos antioxidantes. Outro aspecto que deve ser considerado, quanto a diferenciação dos nutracêuticos e alimentos

funcionais, é que no grupo dos nutracêuticos estão incluídos os suplementos dietéticos e outros tipos de alimentos, enquanto que os alimentos funcionais são apresentados na forma de um alimento comum (KWAK; JUKES, 2001).

### 3.3 *Opuntia ficus indica*

As espécies vegetais pertencentes a família *Cactaceae* possuem distribuição neotropical, no qual se incluem cerca de 100 gêneros e 1500 espécies, havendo, contudo, pouco consenso sobre a caracterização de gêneros e espécies desta família (SOUZA, LORENZI, 2008).

*O. ficus indica* pertence à divisão *Magnoliophyta*, classe *Magnoliopsida*, ordem *Caryophyllales*, família *Cactaceae* e gênero *Opuntia* (NATURDATA, 2009-2016; USDA, 2016). Essa espécie, popularmente conhecida como figueira da Índia ou palma-forrageira, é uma planta perene, de hábito rasteiro a arbustivo, suculenta e ramificada, formada por uma série de caules carnosos, onde se instalam as flores e os frutos (GONZALEZ; JARABO, 1990). Seus frutos são doces, suculentos e comestíveis, com morfologia variável em tamanho (5-10 cm de comprimento e 8-10cm de largura), forma (ovoide, redonda, elíptica e oblonga) e cor (amarelo-esverdeada, amarelos, laranja, vermelha, púrpura ou verdes), apresentam casca fina, grande quantidade de polpa (LEUENBERGER, 1991) e pericarpo duro, onde se encontram pequenos espinhos (SÁENZ, 2006) (Figura 1).

Esta planta é natural do México, mas se difundiu por toda a América Central, América do Sul, África do Sul e Mediterrâneo (LEO et al., 2010), sendo hoje utilizada tanto como alimento quanto na medicina popular (STINTZING; CARLE, 2005; MILLER, 2007; LEO et al., 2010).



Figura 1: Aspectos morfológicos de *Opuntia ficus indica*. A. planta e flor; B. Frutos; C. Variação da polpa do fruto. Fonte <sup>1</sup>

Os frutos do gênero *Opuntia*, popularmente conhecidos como fruto nopal, figo da índia e maçã cacto (PATEL, 2013), são indicados para reduzir os níveis de colesterol, diminuir a pressão arterial, aliviar dores reumáticas, para tratamento de úlceras, fadiga, debilidade hepática, afecções orais, psoríase, edema, dores musculares, conjuntivites, e ainda possuem atividade cicatrizante e anti-inflamatória, além de serem usados também em formulações de cosméticos e na fabricação de ração animal (GALATI et al., 2001; CUNHA, SILVA, ROQUE, 2003; VALENTE et al., 2010).

---

<sup>1</sup> A. <https://www.natue.com.br/natuelife/wp-content/uploads/2016/06/Opuntia-f%C3%ADcus.jpg>;

B. [https://cdn.pixabay.com/photo/2017/09/09/01/14/opuntia-ficus-indica-2730795\\_1280.jpg](https://cdn.pixabay.com/photo/2017/09/09/01/14/opuntia-ficus-indica-2730795_1280.jpg);

C. <https://www.ondacactus.com/cactus-alimento-frutas/>.

Diversos estudos comprovaram que os frutos de *O. ficus indica* são fonte de compostos bioativos, fibras, vitaminas e antioxidantes. A polpa é constituída por água e carboidratos simples, enquanto que as suas sementes possuem muitas fibras e proteínas. Os frutos também são fonte de minerais como potássio, cálcio, sódio, fósforo e magnésio, sendo que na casca é encontrado sódio e nas sementes potássio e fósforo. A polpa ainda é rica em vitamina C e a casca em vitamina E (ALBANO et al., 2015; RAMADAN, MÖRSEL, 2003; TESORIERE et al., 2005; EL KOSSORI et al., 1998; SALIM et al., 2009).

Apesar de *O. ficus indica* ser uma espécie recomendada para consumo, por possuir compostos bioativos e propriedades relacionadas à nutrição, à saúde e ao tratamento de doenças (EL-MOSTAFA et al., 2014), não existem estudos sobre a sua toxicidade e nem que comprovem a segurança de consumo dos seus produtos comercializados.

### 3.4 Cacti-Nea™

A empresa francesa Bio Serae Laboratories desenvolveu, a partir dos frutos de *O. ficus indica*, um nutracêutico denominado Cacti-Nea™ que, devido às suas propriedades diuréticas e antioxidantes avaliados *in vivo*, é especialmente indicado para o controle de peso corpóreo e para a proteção celular contra danos oxidativos ocasionados por radicais livres. Esse produto pode ser consumido em cápsulas ou em sachês (GALENA, 2006).

Este nutracêutico é caracterizado como um desidratado de extrato aquoso de frutos de *O. ficus indica*, cujo processo de obtenção do pó preserva as características nutricionais e as propriedades funcionais do fruto (BISSON et al., 2010).

A Cacti-Nea™ é apresentada na forma de suplemento alimentar, cujas dosagens indicadas para consumo variam entre 500 e 2000 mg/dia. Embora os frutos de *O. ficus indica*, sejam categorizados como alimento funcional, devido ao seu potencial terapêutico (EL-RAZEK et al., 2017; PATEL, 2013).

O uso do nutracêutico da Cacti-Nea™ está relacionado com o potencial terapêutico dos frutos de *O. ficus indica*, conferido pelas atividade antioxidante, efeitos citoprotetores da mucosa gástrica (GALATI et al., 2003), hepatoprotetores (GALATI et al., 2005), proteção endotelial (GENTILE et al., 2004), antiproliferativos para vários tipos de células tumorais

(GONZÁLEZ-PONCE et al., 2018), além de efeitos diuréticos do produto (GALATI et al., 2003).

A variação na cor dos frutos, já citada anteriormente, se dá pela combinação de dois pigmentos da família das betalaínas, a betanina vermelho-púrpura e a indicaxantina amarelo-laranja. Esses pigmentos naturais apresentam ação antioxidante, conforme observado em estudos *in vitro* (BUTERA et al., 2002; GALATI et al., 2003; TESORIERE et al., 2005; GENTILE et al., 2004; GONZÁLEZ-PONCE et al., 2018), *in vivo* (GALATI et al., 2003; 2005) e clínicos (TESORIERE et al., 2005), realizados com nutracêutico Cacti-Nea. Esse composto apresenta um alto teor de betalaínas, sendo a indicaxantina a mais encontrada (65 a 85%) no produto comercializado (BISSON et al., 2010). Estes pigmentos apresentaram ainda, de acordo com ensaios *in vitro* realizados por Gentile et al.(2004), potencial de indução de citocinas e de alteração nas condições redox.

A melhoria do sistema antioxidante de um organismo, pode ser observada pela atividade das enzimas superóxido dismutase, glutatona (peroxidase e S-transferase) e de antioxidantes de baixo peso molecular, como a vitamina C e E (LEE et al., 2002). Estudos de Bisson et al.(2010), realizados com ratos Wistars, onde os autores administraram por via oral a concentração de 240 mg/kg/dia de Cacti-Nea™, observaram que ao final de sete dias houve um efeito antioxidante, comprovado pelo aumento significativo dos níveis de glutatona peroxidase no sangue. Nas condições experimentais acima citadas, foi observado que o nutracêutico também apresentou efeito diurético sem, contudo, haver eliminação excessiva de sódio, potássio e ácido úrico.

### 3.5 Controle de Qualidade

A prática de prevenção, cura e tratamento de doenças pelo uso de compostos biológicos bioativos de plantas medicinais (FIRMO et al., 2011) e de alimentos funcionais (COSTA; ROSA, 2016) vem sendo feita desde as civilizações mais antigas (ANDRADE; CARDOSO; BASTOS, 2007). Inúmeros relatos de literatura fazem referência aos benefícios terapêuticos dessas fontes naturais e, atualmente, os compostos ativos de vegetais vem sendo utilizados pelas farmácias magistrais na aviação de receitas médicas, pelas indústrias farmacêuticas, para a obtenção de medicamentos fitoterápicos, e pelas indústrias de cosméticos, para a obtenção de produtos voltados para o cuidado pessoal e beleza.

O controle de qualidade de um produto pode ser definido como um conjunto de operações que visam verificar e assegurar que esses produtos estejam dentro dos padrões exigidos nos ensaios e medições (MENDES, 2000). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio de suas resoluções e normativas, exige a realização do controle de qualidade de nutracêuticos, que atendam aos requisitos mínimos previstos, especificamente, para esse tipo de produto (BRASIL, 2010; BONFILIO et al., 2010). Durante o processo de produção, armazenamento e manipulação de um nutracêutico pode ocorrer não conformidades, devido a implantação do processo de fabricação inapropriado, falta do cumprimento das boas práticas de fabricação (BPF), embalagens inadequadas, além de problemas nas condições de armazenamento (SANTOS, et al., 2018).

A qualidade dos nutracêuticos inicia-se com a determinação de métodos analíticos qualitativos e quantitativos, que avaliam marcadores (metabólitos secundários) que podem estar relacionados com a propriedade terapêutica do mesmo. Enfatiza-se que, além dos controles de qualidade físico-químicos e microbiológicos rigorosos, recomenda-se ainda ensaios farmacológicos e toxicológicos *in vivo* e *in vitro*, para assegurar a eficácia e segurança do produto a ser comercializado (BASSANI et al., 2013).

Estudos apontam a necessidade do desenvolvimento e padronização de métodos analíticos validados para classe de nutracêuticos. Em resposta, um grupo composto por entidades internacionais como o National Institutes of Health (NIH), AOAC International e o FDA foi formado, tendo como foco principal alertar para as dificuldades dos pesquisadores na identificação das substâncias ativas, para a carência de padrões de referência validados e para a escassez de dados dos produtos nutracêuticos (SULLIVAN & CROWLEY, 2006). No entanto, não há legislação ou compêndio oficial no Brasil sobre o procedimento de controle de qualidade de nutracêuticos (LIRA et al., 2009)

O controle da contaminação microbiana é um parâmetro fundamental para avaliar a qualidade dos nutracêuticos e alimentos funcionais, considerando o risco à saúde pública, a qualidade e a estabilidade do produto. Por serem classificados como produtos não estéreis, sabe-se que há um grande número de microrganismos mesófilos que podem estar presentes tanto no insumo farmacêutico como no produto final e, por isso, a contaminação deve ser evitada ao longo do processo de fabricação. As fontes de contaminação são pontos críticos

na fabricação dos produtos e devem ser monitorados de acordo com as Boas Práticas de Fabricação (BPF) (SALOMON, 2009).

Existe uma grande preocupação com a manutenção da qualidade dos produtos não estéreis, visto que o desvio desta qualidade pode acarretar em grande prejuízo ao usuário, incluindo o desenvolvimento de patologias severas, dependendo do seu estado de saúde (MARIANO-COSTA, RACACCINI, SANTANA, 2017). Neste contexto, devem ser realizados testes físico-químicos e fitoquímicos que certifiquem o controle da qualidade da planta medicinal, do alimento funcional e do nutracêutico, visando garantir a segurança e a efetividade desses produtos.

A análise do teor dos principais componentes biologicamente ativos, presentes em matérias primas de origem vegetal, garantem a autenticidade, pureza e integridade dessas matérias primas usadas no processo. Os testes fitoquímicos procuram caracterizar, por meio de técnicas cromatográficas e analíticas, as principais classes de metabólitos presentes em um material e permitem a separação e o isolamento de substâncias, para o conhecimento da composição química, como também para a padronização do material vegetal e produtos relacionados (SOUZA-MOREIRA, SALGADO, PIETRO, 2010).

Para uma maior efetividade do controle de qualidade de um produto de origem vegetal, devem, então, ser realizadas as análises preconizadas pela legislação vigente (BRASIL, 2010; BONFILIO, et al., 2010), desde o recebimento da matéria-prima, quanto a qualificação dos fornecedores; a qualidade das instalações, dos equipamentos, do recursos humanos envolvidos no manufaturamento do produto final; e o armazenamento, manipulação, até a dispensação do produto final no mercado consumidor (ALVES et al., 2010).

### *3.6 Ensaio Toxicológicos*

O DNA é uma biomolécula que contém informações genéticas herdáveis, necessárias para o desenvolvimento e manutenção de todos os organismos. Contudo, ao longo da vida dos organismos, essa molécula pode sofrer alterações permanentes denominadas mutações, que são causadas por diversos fatores, tanto de origem intrínsecas como extrínsecas do metabolismo da célula. Dentre as mutações, apenas um pequeno número delas pode conferir vantagens para o organismo (MARQUES, RIBEIRO, 2003), pois a

maioria está envolvida com eventos danosos, como interferência na síntese proteica, indução de proliferação ou morte celular ou ainda falhas no crescimento e desenvolvimento do organismo.

Historicamente, o homem utiliza espécies vegetais selecionadas, pelo conhecimento popular, consideradas eficazes e seguras para uso medicinal (FERREIRA, PINTO, 2010). Porém, grande parte dos vegetais usados para este fim não passou por uma avaliação que ateste essa qualidade (BAGATINI et al., 2007), uma vez que se estima apenas 15 a 17 % das plantas medicinais tenham sido avaliadas por testes toxicológicos. Desta forma, existe uma preocupação pontual, quanto a possibilidade do uso irracional dessas plantas, pelo fato de existir o conceito popular de que o que é natural não faz mal, pensamento este que pode colocar em riscos a saúde e, até mesmo, a vida do consumidor (FIRMO et al., 2011).

Os bioensaios de toxicogenética são desenvolvidos com diversos organismos testes, como por exemplo espécies vegetais, microrganismos, animais e cultivo celulares. Existem vários bioindicadores utilizados pela comunidade científica para avaliação da toxicidade (PIRES et al., 2001) e citogenotoxicidade de extratos de plantas medicinais, com destaque para as bactérias, insetos, peixes, poliquetas, anfíbios, roedores, humanos e espécies vegetais, como *Vicia faba* L. e *Allium cepa*. Outro exemplo de organismo teste indicado para ensaios biológicos é o microcrustáceo marinho *Artemia salina*, uma espécie muito utilizada para avaliação de toxicidade pré-clínica de infusões de plantas medicinais (NEVES, 2013; BUENO, PIOVEZAN, 2015). A citotoxicidade pode ser mensurada por meio de alterações no processo de divisão celular, enquanto que a genotoxicidade pode ser avaliada pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos (SOUZA et al., 2005).

Para que um bioensaio seja considerado eficiente, ele deve ser reprodutível, apresentar resultados confiáveis na identificação da atividade biológica do agente avaliado e ser recomendado por agências governamentais e órgãos de pesquisa (e.g. *National Cancer Institute, Environmental Protection Agency, Occupational Safety and Health Administration, World Health Organization*). Contudo, a confiabilidade dos estudos toxicológicos na identificação do potencial toxicológico de um xenobiótico pode ser aumentada, sempre que possível, com a utilização de diferentes organismos testes (RABELLO-GAY, RODRIGUES, MONTELEONE-NETO, 1991).

### 3.6.1 Testes de Genotoxicidade

Durante a divisão celular, podem ser observadas alterações cromossômicas, ou aberrações cromossômicas (AC), tanto estruturais como numéricas. As alterações cromossômicas podem ocorrer de forma espontânea, quando ocorrem ao acaso, sem uma causa aparente, geralmente derivadas de processos intrínsecos ao metabolismo celular, ou de forma induzida, decorrentes de ação de xenobiontes, que apresentem potencialidade de interagir com molécula de DNA ou com componentes celulares envolvidos no processo de divisão celular (FERNANDES et al., 2009). Esses agentes são então denominados de agentes genotóxicos. A grande maioria das ACs ocorre de forma induzida, pois a frequência de aberrações espontâneas em células vivas é muito baixa (cerca de 0,6 %) (NATARAJAN, 2002).

Os compostos químicos podem interagir com o material genético de várias formas e resultar em AC. As substâncias químicas causadoras de danos na molécula de DNA podem ser classificadas em quatro grupos (LEE; STEINERT, 2003): aquelas que agem diretamente sobre a molécula; as que requerem via de metabolização para causarem danos; as que promovem a produção de espécies reativas de oxigênio; e aquelas que inibem o reparo de danos promovidos no DNA ou interferem na sua síntese.

Vários estudos apresentam modelo de testes para detecção de genotoxicidade, que apresentam correlações positivas para carcinogenicidade. O Ensaio Cometa e o Teste do MN são indicados para a avaliação de genotoxicidade e mutagenicidade, especialmente quando aplicados de forma associada (KANG et al., 2013).

### 3.6.2 Organismo teste *Allium cepa*

Os bioindicadores vegetais, como a alface (*Lactuca sativa* L.), tomate (*Lycopersicon esculentum* L.) e cebola (*Allium cepa*), compõem um grupo importante de organismo testes a serem usados em avaliação toxicológica, devido a sensibilidade e boa correlação que essas espécies possuem, em relação a sistemas teste de mamíferos (SOUSA et al., 2010; DELARMELINA et al., 2012). Além disso, essas espécies apresentam menor resistência ou tolerância a compostos aleloquímicos, respondendo, mais facilmente, a efeitos citotóxicos (FERREIRA e AQUILA, 2000).

A espécie vegetal *A. cepa* (cebola) é de fácil cultivo, possui desenvolvimento rápido e meristema abundante, cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n = 16$ ), o que permite a sua observação facilitada em microscopia de luz (POLETTTO et al., 2011; ALMEIDA, 2014). Os ensaios realizados com *A. cepa* são considerados simples, rápidos, não exigem equipamento sofisticado, o que os tornam altamente viáveis pelo seu baixo custo (LEME; MARIN-MORALES, 2009), além de apresentarem alta confiabilidade e concordância com outros testes de genotoxicidade (FISKESJO, 1985; BAGATINI et al., 2007; HISTER, 2015; PORTIS et al., 2016). Outra grande vantagem deste teste está na semelhança do processo de divisão celular de suas raízes com o processo de divisão celular humano. Todas essas características fazem com que ele seja indicado também para avaliação dos efeitos adversos de plantas medicinais (GALEMBECK et al., 2010; POLETTTO et al., 2011; CORREIA et al., 2014).

Os ensaios com *A. cepa* são usados para avaliar parâmetros macroscópicos, como formato e tamanho da radícula, e parâmetros microscópicos, como índice mitótico, o qual indica se a substância tem efeito citotóxico, bem como a ocorrência de anormalidades cromossômicas, as quais indicam se a substância tem efeito genotóxico e mutagênico (GADANO et al., 2002; ARRAES, 2012). Alguns autores afirmam que o teste do *A. cepa* é uma ótima opção para identificar características citogenotóxicas de extratos de plantas, como quebras, pontes anafásicas, formação de micronúcleo e perdas cromossômicas (PINHO et al., 2010; SILVA et al., 2013). A OMS recomenda esse ensaio para avaliar a toxicidade de plantas medicinais, sendo as alterações no ciclo celular e as alterações cromossômicas das células meristemáticas as mais frequentemente usadas para alertar a população sobre a segurança de consumo de certos produtos (VICENTINI et al., 2001; MAURO et al., 2014).

Os ensaios com *A. cepa* permitem avaliar, concomitantemente, a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de determinados compostos, sejam amostras ambientais ou produtos naturais (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Apesar de outros ensaios toxicológicos também serem recomendados e eficazes para avaliar a toxicidade de compostos químicos, como os testes com mamíferos, *in vivo* e *in vitro*; linfócitos e cultura celulares humanas (*in vitro*) e teste de carcinogenicidade com roedores, a espécie *A. cepa* apresenta uma sensibilidade ainda maior que os testes citados (FISKESJÖ, 1985; RANK; NIELSEN, 1994; CHAUHAN et al., 1999).

### 3.6.3 Cultivo celular

No início desse século intensificou-se a discussão sobre o uso de animais em pesquisas científicas, sendo que o tema vem sendo continuamente abordado não só no meio acadêmico e científico, como também pela população em geral (GAUTHIER, GRIFFIN, 2005). Este embate tem feito as universidades abolirem o uso de animais para fins pedagógicos e, quando utilizados para fins experimentais, seguirem o conceito 3 Rs da experimentação animal (redução, refinamento e substituição, derivado dos termos em inglês: Reduction, Refinement and Replacement), proposto por William Russel e Rex Burch, em 1959. A aplicação desse conceito, visa não só garantir o bem estar animal mas incentivar a comunidade científica a reduzir o número de animais experimentados e aprimorar e/ou substituir as técnicas que utilizam (GAUTHIER, 2007). A redução e o refinamento dos experimentos representam os objetivos a serem vencido a curto-prazo e a substituição é a meta maior a ser alcançada (DIPASQUALE; HAYES, 2001).

Diante do objetivo de otimizar metodologias que substituam o uso de animais, tem sido desenvolvidas diversas pesquisas e validados ensaios toxicológicos que possam ser tão ou mais precisos, sensíveis e exatos, quanto os modelos animais. Em 2002, o *The Fund of the Replacement of Animals in Medical Experiments* (FRAME) publicou um documento propondo metodologias de substituição à experimentação animal, tais como modelos computadorizados, uso de organismos inferiores, estágios embrionários de animais superiores; estudos com culturas celulares e estudos éticos com células, tecidos e voluntários humanos (FRAME, 2002; CAZARIN, CORRÊA, ZAMBRONE, 2004).

As linhagens celulares mantidas em cultura são muito utilizadas como modelo de avaliação toxicológica, por serem ensaios sensíveis, de rápida obtenção de resultados (ROGERO et al., 2003) e de fácil manipulação e análises (MORALES, 2008). As culturas celulares constituem ainda uma alternativa interessante de substituição de uso de animais em pesquisa, pois apresentam baixo custo, em relação à manutenção dos animais e são ensaios altamente reprodutíveis. Por essas razões, essas técnicas são muito utilizadas pelas indústrias farmacêuticas, químicas e de cosméticos (TYAKHT et al., 2014), bem como em investigações nas áreas de imunologia, virologia, genética e toxicologia (LEWINSKA et al., 2007). Dentre as linhagens celulares usadas na área da toxicidade de xenobióticos, destacam-se as derivadas de hepatoblastoma primário humano (HepG2), por apresentarem

características semelhantes aos hepatócitos saudáveis, como a morfologia do parênquima hepático, síntese e excreção de diversas proteínas plasmáticas e conservação das enzimas de fase I e II do metabolismo (UHL et al., 2000; KNASMULLER et al., 2004).

#### 3.6.4 Teste do Cometa

O ensaio cometa vem sendo aplicado em estudos de biomonitoramento e de patogenicidade, incluindo neste último as doenças crônicas, predição de tumores e doenças neurodegenerativas (ROSA et al., 2012). Também são avaliados por esse ensaio os níveis de danos e mecanismos de reparo de DNA (GUNASEKARANA; RAJ; CHAND, 2015). Essa avaliação é feita pela detecção de quebras na fita do DNA, caracterizando, assim, um ensaio sensível para a detecção de efeitos genotóxicos de diferentes xenobiontes (GUSTAVINO, 2005).

O ensaio do cometa baseia-se na migração de fragmentos de DNA derivados de quebras promovidas por agentes diversos, que são submetidos a uma corrente eletroforética, em gel de agarose. Quando há quebras do material genético, a migração dos fragmentos de DNA assumem a forma da cauda de um cometa (TICE et al., 2000; DUSINSKA; COLLINS, 2008), o que conferiu a denominação do referido teste. A versão alcalina do ensaio do cometa pode detectar sítios álcali lábeis, quebras de fitas simples e duplas, além de danos oxidativos em células eucarióticas (SINGH et al., 1988, FAIRBAIRN; OLIVE; NEILL, 1995). Esta metodologia não é empregada com o objetivo de verificar mutações, mas sim lesões genômicas que, se não forem corrigidas, podem levar a eventos mutacionais (GONTIJO; TICE, 2003), sendo então consideradas como lesões pré-mutagênicas (KAMMANN et al., 2001).

O ensaio do cometa é amplamente utilizado para avaliar efeitos genotóxicos de efluentes industriais, domésticos e agrícolas, produtos químicos, ingredientes ativos de cosméticos e de plantas medicinais, entre outros, decorrentes de quebras derivadas da ação direta do xenobionte sobre o material genético ou de mecanismos de reparo da célula (WHITE; RASMUSSEN, 1998). A principal vantagem do ensaio de cometa é a sua alta sensibilidade a vários tipos de danos no DNA (BUCKER et al., 2006), sendo considerado, em alguns casos, mais sensível para este fim que o teste de micronúcleo (MATSUMOTO et al., 2006; BUCKER et al., 2006). Este teste permite mensurar os danos promovidos por agentes tóxicos em

células individuais; necessita de um baixo número de células para a realização do teste; e pode ser realizado em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada (LEE; STEINERT, 2003). Este teste foi desenvolvido e primeiramente aplicado por ÖSTLING e JOHANSON (1984), sendo hoje muito utilizado em várias áreas de pesquisa, por ser um modelo que, além das vantagens já descritas, não precisa que as células estejam em divisão para ser processado (STANG; WITTE, 2009; DHAWAN; BAJPAYEE; PARMAR, 2009).

### 3.6.5 Teste do micronúcleo

O teste do MN é considerado uma técnica relativamente simples e vantajosa para avaliação de agentes clastogênicos (promotores de quebras cromossômicas) e aneugênicos (indutores de aneuploidia ou promotores de segregação cromossômica anormal) (HEDDLE, 1973), sendo considerado um ensaio preditivo de mutagênese e câncer. Por este teste ser eficaz, apresentar baixo custo e permitir análise rápida, ele tem sido amplamente utilizado para detectar danos no material genético (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Os MNs são estruturas constituídas de fragmentos e/ou perdas de cromossomos inteiros durante o ciclo celular (FENECH et al., 2011; RIM; KIM, 2015; SABHARWAL et al., 2015) ou ainda de material genético excedente, que é eliminado do núcleo celular, após processo de poliploidização (FERNANDES et al., 2008).

Há evidências que apontam a associação entre o aumento da formação de micronúcleos e outras anomalias nucleares, como pontes nucleossômicas e brotos nucleares, a eventos genotóxicos, que geram instabilidades cromossômicas, frequentemente relacionadas ao processo de carcinogênese. Tais evidências indicam que o teste de micronúcleos pode ser um bom marcador de susceptibilidade fenotípica do câncer (BONASSI et al., 2011, THOMAS et al., 2011). Esse teste, pelas suas características preditivas, é recomendado como padrão para teste de mutagenicidade e referenciado pela OECD e pela *United State Environmental Protection Agency* (USEPA). Por meio deste teste, é possível avaliar a ação mutagênica de diversos agentes, como físicos, químicos, biológicos e de estilo de vida, tanto em abordagens *in vivo* como *in vitro* (FENECH et al., 1999). Desta forma, considerando que o uso de nutracêuticos e plantas medicinais está relacionado com estilo de vida de uma população, este teste também pode representar um bom marcador para avaliar a toxicidade de materiais botânicos usados na alimentação e na medicina popular.

### 3.6.6 Estresse oxidativo

As espécies reativas (ERs) apresentam a capacidade de retirar elétrons de outros compostos celulares, sendo capazes de provocar lesões oxidativas em várias macromoléculas, fato que pode levar à perda total da função das mesmas (ROVER JÚNIOR, VELLASCO, HÖEHR, 2001; CRUZAT, ROGERO, BORGES, TIRAPEGUI, 2007).

Diversos estudos têm sido realizados com o objetivo de elucidar o papel que as ERs, conhecidas como radicais livres (RL), têm sobre os processos fisiológicos e patológicos, visto que a oxidação é parte essencial do metabolismo de organismos aeróbicos (FERREIRA, MATSUBARA, 1997; DAVID, DAVID, BARREIRO, 2006).

Os RL são átomos ou moléculas produzidas de forma contínua, endogenamente ou exogenamente (FERREIRA; MATSUBARA, 1997, IVANOVA; YANKOVA, 2013). A cadeia respiratória mitocondrial é um importante sítio de produção de ERS na célula, portanto a principal fonte endógena dos RL. Isso porque, a mitocondria atua como mediadora da transferência de elétrons em várias reações bioquímicas, desempenhando, assim, funções relevantes, principalmente, no metabolismo do oxigênio (IVANOVA; YANKOVA, 2013; LAGOUGE; LARSSON, 2013). Exogenamente, as ERS são produzidas por exposição a fatores extrínsecos à célula, como a luz ultravioleta, principalmente nos comprimentos de onda maiores que 280 nm (UVA e UVB); irradiação ionizante; e agentes químicos, sendo estes últimos decorrentes do estilo de vida, como o tabagismo, etilismo, dietas ricas em sódio, aditivos alimentares e excesso de calorias. As ERS podem também ser produzidas por processos patológicos, como, por exemplo, o que ocorre em uma resposta inflamatória celular (BERRA, MENCK, 2006), o catabolismo de ácidos graxos, a degradação da xantina a ácido úrico, auto-oxidação de catecolamina (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007), e por metabolismo dos xenobióticos, que pode acarretar em diversas enfermidades, como câncer, desordens cardiovasculares e neurodegenerativas, além do declínio do sistema imune e envelhecimento (SOHAL, 2002; SOUSA et al., 2007).

As principais ERs distribuem-se em dois grupos: os radicalares (com elétrons desemparelhados): hidroxila ( $\text{HO}^{\bullet}$ ), superóxido ( $\text{O}_2^{\bullet-}$ ), peroxila ( $\text{ROO}^{\bullet}$ ) e alcoxila ( $\text{RO}^{\bullet}$ ); e os não-radicalares (sem elétrons desemparelhados, mas com função oxidante): oxigênio, peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) e ácido hipocloroso ( $\text{HClO}$ ) (VASCONCELOS et al., 2007)

O radical HO<sup>•</sup> é considerado o mais deletério para os organismos, pois possui meia vida muito curta, o que dificulta o seu sequestro pelos antioxidantes endógenos (BARREIROS & DAVID, 2006). Sua formação ocorre por dois mecanismos: reação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> com metais de transição e por homólise da água, decorrente de reação de baixa energia (e.g. exposição a luz visível, UV ou radiação ionizante). No organismo, os metais de transição mais importantes para a ocorrência da reação com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> são Cu<sup>1+</sup> e Fe<sup>2+</sup>. Nesse sistema, a importância do ferro é mais pronunciada, devido a sua maior biodisponibilidade no organismo (OLIVEIRA et al., 2015).

A Figura 2 apresenta os mecanismos de lesão celular conferidos por estresse oxidativo derivados de ação endógena e exógena, sendo estes mecanismos precursores de uma série de doenças crônicas não transmissíveis.

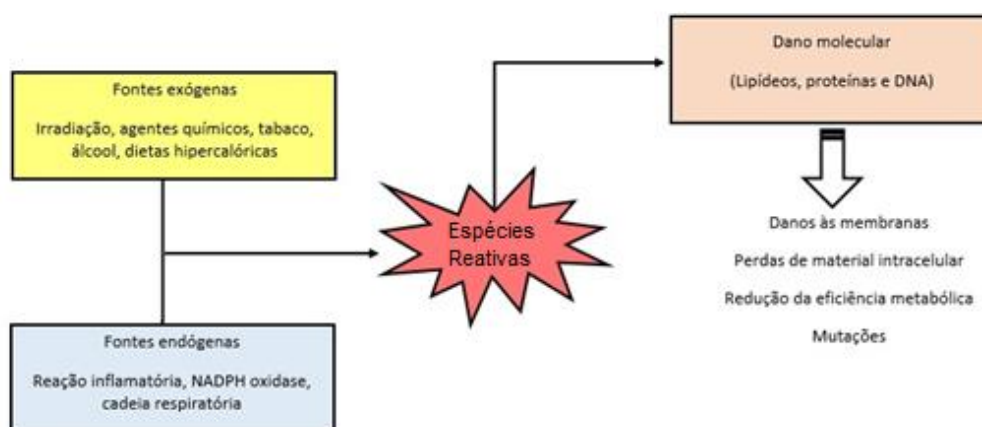


Figura 2: Esquema da indução de lesão celular causada por radicais livres (Elaborado pelo autor).

A peroxidação lipídica também é um dano oxidativo importante associado aos efeitos tóxicos de diversas substâncias químicas, às lesões teciduais e ao desenvolvimento de estados patológicos (FRIDOVICK, 1998; VALKO et al., 2006). Além disso, a formação de oxigênio reativo e peroxinitrito leva ao colapso dos potenciais de membrana e de síntese de ATP, além da fragmentação do DNA nuclear. Com isso, a célula sofre necrose, liberando seu conteúdo e induzindo processos inflamatórios, o que promove a inicialização de resposta imune. Essa resposta desencadeia a produção de mediadores inflamatórios e o recrutamento de leucócitos específicos (macrófagos e neutrófilos), na tentativa de regenerar o tecido afetado (JAESCHKE, BAJT, 2010; BUNCHORNTAVAKUL, REDDY, 2013).

Em um estado de homeostase celular, as ERs são neutralizadas por enzimas endógenas antioxidantes. Porém, sob condições patológicas, ocorre um desequilíbrio entre o acúmulo de ERs e as enzimas antioxidantes, resultando em efeitos nocivos sobre macromoléculas (lipídios, proteínas, DNA), bem como sobre o sistema imunológico. Além disso, a oxidação de proteínas pode ativar o sistema imune, induzindo o aparecimento de doenças autoimunes e afetando importantes eventos de regulação celular (LENAZ et al., 2000; MANGGE et al., 2004; FREY et al., 2007; MANGGE et al., 2010, DALVI et al., 2013; MAES et al., 2013; MAES, 2013; REININGHAUS et al., 2014).

Os organismos vivos aeróbios utilizam oxigênio atmosférico para a sua sobrevivência e reprodução. O oxigênio molecular ( $O_2$ ), obtido da atmosfera, apesar de ser vital para os organismos, é fonte de produção de espécies reativas, que ameaçam a integridade celular, pois, como já expresso, podem promover oxidação de biomoléculas e, conseqüentemente, comprometer processos biológicos importantes (AUGUSTO, 2006). O dano oxidativo de biomoléculas pode provocar inativação enzimática, mutação, ruptura de membrana, aumento na aterogenicidade de lipoproteínas plasmáticas de baixa densidade e morte celular (HALLIWELL, GUTTERIDGE, 2007).

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

Serão apresentados neste item 4 apenas as descrições metodológicas que não foram contempladas, na sua íntegra, nos artigos científicos apresentados no item 5, referente aos “Resultados e Discussão”.

O nutracêutico em estudo e as demais metodologias estão apresentados, de forma detalhada, em seus respectivos artigos a serem enviados para publicação em revistas especializadas das áreas de Controle de Qualidade de Produtos Naturais, Biologia Celular e Toxicologia.

Os tópicos a seguir são complementares aos descritos no Artigo I: “Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante atividade em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae* e controle de qualidade da Cacti-Nea™ (Resultados e Discussão).

### 4.1 Caracterização fitoquímica do Nutracêutico

#### 4.1.1 Ensaio Qualitativo

O procedimento para os ensaios fitoquímicos qualitativos foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Mello e Petrovick (2000) e Falkenberg et al.(2003). Os resultados obtidos baseiam-se em reações de mudança de coloração e/ou formação de precipitados, além das propriedades físico-químicas dos metabólitos secundários que compõem o nutracêutico. Inicialmente, foi preparado, em tubos de ensaios, extrato aquoso com o nutracêutico, dissolvendo 0,2 g de Cacti-Nea™ em 2 mL de água, para cada tubo. Esse procedimento foi realizado em triplicata, o que totalizou o preparo de 18 tubos.

Foram realizados com os extratos preparados com o nutracêutico os testes de taninos, flavonóides, saponinas, alcaloides, glicosídeos cardiotônicos e antraquinonas descritos a seguir.

#### 4.1.1.1 Teste para taninos

Nos tubos de ensaio, preparados conforme descrição acima, foram adicionadas três gotas da solução alcoólica de  $\text{FeCl}_3$  2%. O material foi agitado por cerca de 10 segundos, para ser realizada a avaliação qualitativa de cor e formação de precipitado. O precipitado de tonalidade azul é indicativo de presença de taninos hidrolisável, e o verde, presença de taninos condensados.

#### 4.1.1.2 Teste para flavonoides

O teste de cianidina ou teste de Shinoda foi realizado em um tubo de ensaio contendo o extrato aquoso, onde se adicionou 0,5 cm de magnésio em fita e 2 mL de ácido clorídrico concentrado. O término da reação é indicado pelo fim da efervescência na solução, no qual podem ser observadas colorações que variam de parda a vermelha, que indicam a presença de flavonoides no extrato.

#### 4.1.1.3 Teste para saponinas

O teste de saponina foi realizado, adicionando nos tubos com extrato 2 mL de clorofórmio e 5 mL da água destilada. Logo após, a solução foi filtrada e disposta em um tubo de ensaio limpo. Em seguida, a solução foi agitada por 3 minutos para observação de formação de espuma. A presença de espuma persistente e abundante (colarinho) é indicativa de presença de saponinas.

#### 4.1.1.4 Teste para alcaloides

No tubo com o extrato foram adicionadas quinze gotas de hidróxido de sódio 1 % e 2 mL de água. Posteriormente, foram adicionados neste tubo 2 mL de clorofórmio. Após esse processo, foi desprezada a fração aquosa da solução, e recolhida em um tubo limpo a fração clorofórmica, que recebeu cerca de 5 gotas de ácido clorídrico a 1 % e 2 mL de água. Em seguida, foi realizada uma nova extração líquido/líquido, para a eliminação da fração clorofórmica. Os testes para a avaliação da presença de alcaloides foram realizados com a

fração aquosa ácida acrescida de três gotas do reagente de Drangendorff. A formação de precipitados insolúveis e floculosos confirmam a presença de alcaloides.

#### 4.1.1.5 Teste para glicosídeos cardiotônicos

O teste de glicosídeos cardiotônicos foi realizado pela reação de Lieberman-Burchard (anidrido acético + ácido sulfúrico concentrado). No, tubo de ensaio contendo o extrato, foram adicionados 3 mL de clorofórmio e 2 mL de anidrido acético. Após agitação suave, foram acrescentadas, cuidadosamente, nesta solução três gotas de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> concentrado. O tubo foi novamente agitado, para observar se houve mudança de coloração (de cor salmão para coloração azul evanescente seguida de verde), indicativa da presença de glicosídeos.

#### 4.1.1.6 Teste para avaliação da presença de antraquinonas

Para teste de antraquinona, foram adicionados 2 mL de solução de NH<sub>4</sub>OH a 10% a um tubo de ensaio contendo o extrato. Após agitação suave, foi observada alteração da cor da solução. As colorações rósea, vermelha ou violeta, foram consideradas indicativas da presença de antraquinona.

## Avaliação do controle de qualidade e das atividades antimicrobiana e antioxidante da Cacti-Nea™

NAVARRO, F.F.<sup>1,2</sup>; FOGUEL, J.<sup>2</sup>; BORGES, U<sup>2</sup>; MARIN-MORALES, M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS, Araras, SP, Brasil.

### RESUMO

Os ensaios de controle de qualidade agregam confiança e segurança na utilização dos nutracêuticos, que são classificados como alimentos ou parte deles que apresentam benefícios à saúde. A Cacti-Nea™, caracterizada como o extrato aquoso desidratado do fruto de *Opuntia ficus indica* possui diversos compostos metabólitos responsáveis por diversas ações terapêuticas. Diante do exposto, o objetivo do estudo foi realizar a avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e realizar o controle de qualidade do nutracêutico. A atividade antimicrobiana foi realizada através da técnica de difusão em discos, enquanto para a avaliação da atividade antioxidante, foram consideradas as taxas de viabilidade celular das leveduras, e as técnicas de controle de qualidade foram realizadas de acordo com as metodologias preconizadas pela Farmacopeia Brasileira 4 (2000) e 5 edição (2010). Os resultados indicam que as concentrações de Cacti-Nea™ avaliadas apresentaram ação antimicrobiana frente aos microrganismos: *Candida albicans*, *E. coli*, *Staphylococcus aureus* e *Pseudomonas aeruginosa*; a avaliação da atividade antioxidante demonstrou que a taxa de sobrevivência das células de leveduras são aumentadas quando expostas a Cacti-Nea™, o controle de qualidade físico-químico e microbiológico apresentaram resultados dentro do preconizado pelo fabricante e Farmacopéia Brasileira. Infere-se que tais dados permitem traçar a qualidade do nutracêutico frente aos ensaios realizados e o potencial de sua utilização como agente antimicrobiano e antioxidante.

Palavra-chaves: *Saccharomyces cerevisiae*, nutracêutico, *Opuntia ficus indica*, microrganismos patogênicos.

Artigo a ser encaminhado para Journal of Natural Products, ISSN: 0163-3864.

## 1. INTRODUÇÃO

Os nutracêuticos são classificados como alimentos ou parte dos alimentos que apresentam benefícios à saúde, incluindo a prevenção e/ou tratamento de doenças. Nesta categoria, são encontrados desde nutrientes isolados, suplementos dietéticos até produtos naturais e alimentos processados (MORAES; COLLA, 2006).

Ao utilizar alimentos funcionais e nutracêuticos para prevenção e/ou tratamento de doenças, são necessários estudos que certifiquem os seus efeitos terapêuticos. Para a segurança e garantia de autenticidade de um nutracêutico, o produto deve atender requisitos como identificação correta da espécie, certificação de pureza e de princípios ativos, tipo de plantio e colheita, avaliação da adequação da técnica utilizada para a sua produção e modo de comercialização. Também devem ser considerados nesta avaliação, outros aspectos como características físicas, químicas, físico-químicas e microbiológicas pré-estabelecidas pelas Farmacopeias, Códigos Oficiais e Literaturas científicas da área de produtos naturais (ZARONI et al., 2004; MIGLIATO et al., 2007; MICHELIN et al., 2010).

A espécie *Opuntia ficus indica*, conhecida popularmente no Brasil como figueira da índia ou palma-forrageira, é uma cactácea nativa do México, amplamente disseminada por toda a América Central, do Sul, África do Sul e Mediterrâneo (LEO et al., 2010). O fruto desta planta é comestível, doce e succulento, sendo amplamente utilizado na alimentação humana e de animais, bem como nas indústrias farmacêutica, de cosméticos e têxtil (BARBERA, 2001; SILVA et al., 2016; BENZIANE et al., 2017). Dentre suas aplicações na área da farmacologia, destaca-se o seu uso na produção do nutracêutico Cacti-Nea™. Este composto é obtido a partir da destilação do extrato aquoso de frutos de *O. ficus indica*, processo este que preserva as propriedades funcionais do fruto. O produto comercial é solúvel em água, naturalmente rico em betalaínas e apresentado na forma de pó de cor âmbar-a-vermelho (BISSON et al., 2010).

Diante do panorama exposto, foi realizado a avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante em células de levedura *Saccharomyces cerevisiae* e realizado o controle de qualidade do nutracêutico.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana de diferentes concentrações do nutracêutico Cacti-Nea™ foi avaliada em teste *in vitro*, pelo método de difusão em disco de papel absorvente sobre ágar (BAUER *et al.*, 1966). O preparo dos discos seguiu a técnica descrita na Farmacopeia Brasileira (2010).

Os microrganismos (MO) *Candida albicans* (ATCC 64548), *Escherichia coli* (ATCC 10531A1), *Propionibacterium* (ATCC 6919), *Aspergillus brasiliensis* (ATCC 16404), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27653), utilizados para o ensaio de difusão em disco, pertencem à coleção de microrganismos do Departamento de Farmácia do Centro Universitário Hermínio Ometto- UNIARARAS. Os MOs utilizados no teste foram, primeiramente, repicados em caldo BHI (Infusão de Cérebro e Coração bovino) e, posteriormente, incubados em estufa, até atingirem a turvação equivalente da escala de McFarland (em solução fisiológica – tubo 0,5), correspondente a  $10^7$  UFC/mL para leveduras e fungos (incubação a 27° C) e  $10^8$  UFC/mL para bactérias (incubação a 36° C) (BARRY, 1986; KONEMAN, 1997). Na sequência, os meios com os MOs foram inoculados em placas contendo ágar Mueller Hinton, que receberam discos de papel estéreis, de 5 mm de diâmetro, embebidos com 10 µL da solução das concentrações avaliadas (0,008; 0,006; 0,004; 0,002 g/mL), que corresponderam a uma de massa de Cacti-Nea™ equivalente a  $8 \times 10^{-10}$  g,  $6 \times 10^{-10}$  g,  $4 \times 10^{-10}$  g e  $2 \times 10^{-10}$  g, respectivamente, por disco.

O teste-controle foi realizado com discos do antibiótico ciprofloxacino 30 µg/disco e do antifúngico nistatina 30 µg/disco, disponíveis comercialmente. A incubação foi feita em estufa a 36 °C, durante 48 horas. Os testes foram realizados em triplicata e os resultados expressos em mm de halo, obtido pela média aritmética dos diâmetros dos halos de inibição formados ao redor dos discos, nas 3 repetições.

## 2.2 Citotoxicidade – Viabilidade Celular

O ensaio de citotoxicidade em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*, foi realizado de acordo com a técnica proposta por Soares, Andreatza e Salvador (2005), com adaptações. Neste teste foi utilizado o Paration no lugar do Paraquat, como agente estressor.

### 2.2.1 Linhagem

A linhagem da levedura *Saccharomyces cerevisiae* utilizada no teste de viabilidade celular foi a ATCC® 9763™.

### 2.2.2 Agente estressor

Como agente estressor oxidante foi utilizado o agroquímico Paration® na concentração de 0,2 mM. Esse agente é um pesticida agrícola, pertencente ao grupo dos organofosforados.

### 2.2.3 Meios de cultura e soluções

Para a cultura de levedura, foi utilizado o caldo Sabouraud. Após incubação do caldo com levedura, por 24 horas em estufa a 27° C, foi realizada uma diluição da concentração de células deste caldo, adicionando NaCl 0,9 % (p/v), até atingir a turvação desejada na escala de McFarland (tubo 0,5). Na sequência, foi estimada a concentração de células presentes no caldo obtido e, após plaqueamento em meio Sabouraud sólido, foi determinado o número de UFC viáveis nesta cultura.

### 2.2.4 Determinação da viabilidade celular

Para a determinação da citotoxicidade da Cacti-Nea™,  $2 \times 10^7$  células de levedura/mL (padronizadas pela escala de McFarland) foram tratadas com as soluções do nutracêutico, em presença e ausência do agente estressor (Paration). Após incubação, a 28° C por 21 horas, as células tratadas foram plaqueadas em meio Sabouraud. As placas foram incubadas a 28° C, por 48 horas. Após este período, foram contadas as colônias formadas em cada placa e determinado os percentuais de sobrevivência celular. Os testes com as

diferentes concentrações de Cacti-Nea™ foram realizados em triplicatas. O cálculo de redução de danos foi realizado de acordo com a equação:

$$\text{Red. Danos (\%)} = \frac{(CP - TTO)}{(CP - CN)}$$

Onde:

CP: Controle positivo;

CN: Controle Negativo;

TTO: Tratamentos.

### 2.3 Controle de Qualidade físico-químico

#### 2.3.1 Densidade aparente

Quantidades equivalentes a um volume aproximado de 0,95 mL do nutracêutico Cacti-Nea™ foram usadas para o preenchimento de cada uma das 25 cápsulas gelatinosas de tamanho 00 a serem dispostas no encapsulador. Em seguida, foi determinado o peso médio total das cápsulas e a massa relativa de Cacti-Nea™/cápsula. A relação massa Cacti-Nea™/volume da cápsula (0,95 mL) corresponde a densidade aparente calculada (MARTINS; SACRAMENTO, 2004).

#### 2.3.2 Determinação da umidade do nutracêutico, por dessecação em balança de infravermelho (IV)

Amostras exatas de 4,0 g do nutracêutico foram submetidas ao aquecimento (105 °C) em balança de raios IV, até atingir um peso constante. Quando a dessecação atinge a estabilidade, o equipamento emite, automaticamente, a porcentagem de umidade do produto avaliado (GARCIA-AMOEDO; ALMEIDA-MURADIAN, 2002).

#### 2.3.3 Determinação do teor de cinzas

Para a determinação do teor de cinzas, primeiramente, foram colocados, em mufla a 450 °C, durante 30 min, cadinhos de porcelana para a calcinação dos mesmos. Os cadinhos foram resfriados em dessecador e tiveram as respectivas massas determinadas em balança analítica. Amostras exatas de 3,0 g do nutracêutico foram transferidas, imediatamente, para esses cadinho calcinados, que foram novamente incinerados em mufla aquecida a 450 °C,

durante 2 h. Em seguida, eles foram arrefecidos em dessecador para a determinação da massa do conjunto. Esta operação foi repetida até a obtenção de valores de massas constantes. Após a obtenção do peso constante, foi calculada a porcentagem de cinzas totais, pela diferença entre o peso inicial e final da amostra do nutracêutico (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

#### 2.3.4 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

Os resíduos obtidos na determinação de cinzas totais foram fervidos, durante 5 min, com 25 mL de solução de ácido clorídrico a 7 % (p/V), em cadinhos cobertos com vidro de relógio. Em seguida, o vidro foi lavado com 5 mL de água quente e essa água transferida, de volta para o cadinho. O material do cadinho foi filtrado em papel de filtro isento de cinzas e o resíduo insolúvel ao ácido usado, preso ao papel de filtro, foi lavado com água quente, até que o filtrado atingisse pH neutro. O papel de filtro contendo o resíduo foi transferido para o cadinho original, seco em chapa quente e incinerado a 500 °C, até obtenção de peso constante. Foi então calculada a porcentagem de cinzas insolúveis em ácido, pela diferença entre massa inicial e final do nutracêutico, subtraída também do peso do papel utilizado (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

#### 2.3.5 Determinação do teor de extrativos

Uma amostra de 1,0 g do nutracêutico, exatamente pesada, foi submetida a decocção com 100 mL de água durante 10 min. Após o resfriamento, o volume foi completado para 100 mL em balão volumétrico. A solução foi filtrada em papel de filtro, e os primeiros 20 mL desprezados (WHO, 1998). Do restante do filtrado, foi separada uma alíquota equivalente a 20 g, em pesa-filtro previamente tarado, e evaporado até *secura* em banho-maria, sob agitação constante. O resíduo obtido após evaporação foi submetido a dessecação em estufa (105 °C), durante 3 h. Em seguida, o material foi resfriado em dessecador e pesado (em triplicata). O teor de extrativos foi calculado em massa percentual, segundo a fórmula:

$$TE = (g \times FD \times 100) / m$$

Onde: TE = teor de extrativos (%; m/m), g = massa de resíduo seco (g), m = massa total da amostra (g), FD = fator de diluição da amostra inicial de 5x.

#### 2.4 Controle de qualidade microbiológico.

O controle de qualidade microbiológico foi realizado seguindo a 5ª edição da Farmacopeia Brasileira (2010), de acordo com a metodologia indicada para análise de produtos não estéreis, contemplando os testes de contagem de MOs viáveis e pesquisa e identificação de patógenos. Os ensaios foram conduzidos em triplicata e os resultados expressos pelo valores médios.

### 3 RESULTADOS

O nutracêutico Cacti-Nea™ avaliado é distribuído no Brasil pela empresa Galena®. O lote testado no presente estudo foi o de número 1608029502, com validade para 28/11/2018, comercializado na forma de pó microgranulado, de coloração laranja, odor fraco e sabor adocicado, obtido do fruto de *O. ficus indica*.

#### 3.1 Atividade antimicrobiana

Os resultados do ensaio de avaliação da atividade antimicrobiana do nutracêutico Cacti-Nea™ mostram que a concentração mais eficaz como antibiótico foi a de 0,008 g/mL. Essa concentração apresentou uma atividade antimicrobiana superior a registrada para o fármaco usado como CP (Ciprofloxacino), para as cepas *E. coli* e *P. aeruginosa*, como pode ser visto na tabela 1.

Tabela 1: Atividade antimicrobiana de diferentes concentrações de Cacti-Nea™ para diferentes cepas de microrganismos.

Microrganismo	Nistatina 10 µg/disco	Ciprofloxacino 30 µg/disco	Concentrações (g/mL)			
			0,008	0,006	0,004	0,002
<b>Fungos e leveduras</b>						
<i>Candida albicans</i> ATCC 64548	10,85 ± 0,7778	N/A	11,1 ± 0,8485	7,1 ± 1,1313	6,15 ± 1,061	0,0
<i>Aspergillus brasiliensis</i> ATCC 16404	9,05 ± 0,4950	N/A	0,0	0,0	0,0	0,0
<b>Bactérias</b>						
<i>Propionibacterium sp.</i> ATCC 6919	N/A	10,55 ± 1,202	0,0	0,0	0,0	0,0
<i>Escherichia coli</i> ATCC 10531A1	N/A	23,15 ± 1,061	28,2 ± 1,1314 *	22,8 ± 1,2728	11,05 ± 0,9192	6,65 ± 1,060
<i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 25923	N/A	16,5 ± 0,2829	15,5 ± 0,3028	9,9 ± 0,2828	7,15 ± 0,3535	0,0
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> ATCC 27653	N/A	17,05 ± 0,495	19,05 ± 0,495*	13,4 ± 0,466	11,65 ± 1,06	7,4 ± 0,845

N/A: não aplicável, \* diferença estatisticamente significativa, quando comparada ao controle positivo (CP) ( $p < 0,05$ ) teste ANOVA, seguido de pós-teste Tukey.

### 3.2 Determinação da viabilidade celular

A avaliação da citotoxicidade das soluções de Cacti-Nea™ foi realizada submetendo a levedura *S. cerevisiae* à diferentes concentrações do nutracêutico, ao agente estressor oxidante (paration) e à associação desses dois compostos. Pelos resultados obtidos, foi observado uma diminuição da viabilidade celular das concentrações de Cacti-Nea™ e o CN. Já os ensaios realizados somente com paration, mostraram que esse agroquímico induziu uma taxa de mortalidade superior a 80% para o MO. Contudo, quando a levedura foi submetida a associação de Cacti-Nea™ e paration, pode-se observar que houve uma reversão da toxicidade desse agroquímico, concentração diretamente dependente, sendo que a maior concentração testada foi a que apresentou a maior ação antioxidante (Tabela 2).

Tabela 2: Viabilidade, citotoxicidade e redução de dano da Cacti-Nea™ sobre células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*

Tratamento	Viabilidade celular (%)	Citotoxicidade (%)	Redução de danos (%)
CN	99,97 ± 1,686	80%	N/A
CP	< 20,00	0,03%	N/A
<i>Cacti-Nea™™ (g/mL)</i>			
0,008	89,757 ± 2,128*	10,24%	N/A
0,006	85,659 ± 2,516*	14,35%	N/A
0,004	81,59 ± 3,511*	18,41%	N/A
0,002	76,26 ± 2,353*	23,74%	N/A
<i>Cacti-Nea™ (g/mL) + Paration 0,2mM</i>			
0,008	71,344 ± 2,353*	28,65%	64,2%
0,006	62,301 ± 1,527*	37,69%	52,9%
0,004	59,019 ± 0,998*	40,99%	48,8%
0,002	43,034 ± 2,021*	56,97%	28,8%

CN: crescimento das células somente em solução de NaCl 0,9%; CP: Células tratadas com Paration 0,2mM, N/A: não aplicável. \* Diferença estatisticamente significativa, quando comparada ao CN (p<0,05).

### 2.5 Controle de Qualidade Físico-Químico

Os resultados do controle de qualidade do nutracêutico Cacti-Nea™ estão expressos na tabela 3. Estes ensaios são realizados para a caracterização e certificação da pureza de um nutracêuticos/plantas medicinais de uso via oral, Todos os parâmetros avaliados neste estudo atenderam às especificações vigentes (Farmacopeia Brasileira, 2000 e 2010 e laudo técnico do fornecedor - Galena®).

Tabela 3: Análises de controle de qualidade do nutracêutico Cacti-Nea™ (bruto).

<b>Ensaio</b>	<b>Valores médios ± desvio padrão</b>	<b>Valores de referência</b>
Densidade aparente (g/mL)	0,63 g/mL ± 0,0258	Mínimo 0,30 g/mL*
Umidade	6,6 % ± 0,3605	Máximo 14%***
Cinzas totais	3,73% ± 0,521	Máximo 14%*
Cinzas insolúveis	0,37 ± 0,781	Máximo 3%**
Teor de extrativos	19,23%±0,115	Informativo

\* Especificação do Fornecedor; \*\* Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010), \*\*\* Farmacopéia Brasileira 4ª edição (2000)

### 2.6 Controle de Qualidade Microbiológico

Os resultados obtidos nos testes desenvolvidos para avaliar o controle de qualidade microbiológico do nutracêutico Cacti-Nea™ estão apresentados na Tabela 4. Estes testes são exigidos para garantir a segurança microbiológica de produtos não estéries, destinado ao consumo humano, voltados a área da saúde. Os produtos devem atender os valores de referência pré-estabelecidos pela legislação vigente. Todos os parâmetros avaliados atenderam as especificações preconizadas pela Farmacopeia Brasileira, (2000 e 2010) e laudo técnico do fornecedor - Galena®.

Tabela 4: Controle de qualidade microbiológica da Cacti-Nea™.

Ensaio	Valores médios ± desvio padrão	Valores de referência
Contagem de MOs mesófilos:		
Bactérias viáveis	1,33 x 10 <sup>2</sup> UFC/g ±0,234	Máximo 5 x 10 <sup>3</sup> UFC/g*
Fungos e Leveduras	1,9 x 10 <sup>1</sup> UFC/g ±0,128	Máximo 5 x 10 <sup>2</sup> UFC/g*
Identificação de patógenos:		
Bactérias Gram <sup>-</sup> Bile Tolerante	< 10 UFC/g	Máximo 10 <sup>3</sup> UFC/g**
<i>Escherichia coli</i>	Ausência	Ausência**
<i>Staphylococcus aureus</i>	Ausência	Ausência**
<i>Salmonella sp</i>	Ausência	Ausência**
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Ausência	Ausência**
<i>Candida albicans</i>	Ausência	Ausência**

\* Especificação do Fornecedor; \*\* Farmacopéia Brasileira 5ª edição (2010), MO: microrganismo. UFC: unidades formadoras de colônia.

#### 4 DISCUSSÃO

O interesse da população pelo uso de terapias naturais é crescente, o que demonstra a necessidade de se avaliar com mais critérios os produtos naturais usados para este fim (DE-SOUZA et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2006a; OLIVEIRA et al., 2006b; LIS-BACHIN; DEANS, 1997).

Bandeira et al. (1998) concluíram, por meio de um amplo estudo realizado com diferentes técnicas utilizadas para avaliação de atividade antimicrobiana de extrato vegetal, que o teste de difusão em ágar apresenta uma alta eficiência para avaliar a atividade antimicrobiana de compostos solúveis em água, por possibilitar a difusão destes para o meio de cultura. Pela técnica descrita acima (antibiogramas) realizada com as diferentes concentrações aquosas de Cacti-Nea™, pode-se observar que esse composto, na concentração de 0,008 g/ml, apresenta uma atividade antimicrobiana superior ao controle positivo para os procarintes *E. coli* e *P. aeruginosa*; observa-se também atividade antimicrobiana frente a levedura *C. albicans* e a bactéria *S. aureus*; e nula para o fungo *A. brasiliensis* e a bactéria *Propionibacterium sp*. Esses resultados podem estar relacionados à grande concentração de compostos secundários presentes nos frutos de *O. ficus indica*

(BISSON et al., 2010), dentre eles os fenólicos, citados por Stevenson et al. (2007) e Faller et al. (2010), que, provavelmente, sejam os responsáveis pela ação antimicrobiana observada neste estudo. Estes dados corroboram os descritos por Bandeira et al. (1998), quanto a eficiência da metodologia de difusão em ágar para avaliação da atividade antibacteriana, reforçando a atividade biológica dos compostos presentes nos fruto de *O. ficus indica* e, conseqüentemente, no seu nutracêutico.

As taxas de sobrevivência da levedura *S. cerevisiae*, tratadas com as diferentes concentrações de Cacti-Nea™, mostram que o efeito citotóxico do Paration® foi reduzido, quando este agroquímico foi associado com as diferentes concentrações da Cacti-Nea™ (concentração – dependente). Esses dados sugerem uma interação entre o nutracêutico e o agroquímico, esta interação resultou em uma redução de danos, onde a concentração 0,008g/ mL reduziu 64,2% do dano causado pelo Paration. Resultados semelhantes foram registrados por Soares, Andrezza e Salvador (2004), para quercetina, um importante composto fenólico, utilizado como padrão para diversos ensaios de avaliação de atividade antioxidante. Os autores citam ainda que a associação de compostos antioxidantes com agentes estressores presentes em meio de cultura, aumenta, significativamente, a taxa de sobrevivência de leveduras.

A levedura *S. cerevisiae* possui as enzimas SOD citossólica e mitocondrial, capazes de detoxificar o radical  $O_2^-$ , diminuindo seus efeitos deletérios. Por essa razão, a levedura *S. cerevisiae* é considerada um dos melhores modelos unicelulares para estudos de estresse oxidativo. A levedura é provida de núcleo e de organelas com metabolismo semelhante à de eucariotos superiores (HENRIQUES et al., 2001). Embora não haja dúvidas sobre o benefício da utilização de antioxidantes em alimentos, cosméticos e medicamentos (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2007), os dados obtidos neste trabalho mostram a importância e a necessidade de se avaliar a ação antioxidante de mais produtos de origem natural, para que haja uma melhor elucidação dos seus mecanismos protetivos. Esses estudos poderão incentivar o uso consciente e seguros de nutracêuticos pela população.

Estudos apontam a necessidade do desenvolvimento e padronização de métodos analíticos validados para classe de nutracêuticos. No entanto, não há legislação ou compêndio oficial no Brasil sobre o procedimento de controle de qualidade de nutracêuticos (LIRA et al., 2009). Para parâmetros de qualidade físico-químico e microbiológico, aplicou-

se as especificações descritas na Farmacopeia (2010) para drogas vegetais Drogas vegetais que serão submetidas a processos extrativos a frio.

Controlar a qualidade de um produto, é assegurar a sua conformidade com os compêndios oficiais e especificações, de forma a garantir que o mesmo, quando consumido, não represente riscos à saúde. As ferramentas para avaliar a qualidade físico-química de um produto são; ensaios de densidade aparente; determinação da umidade, dos teores de cinzas, de cinzas insolúveis em ácido; e de compostos extrativos.

O controle de qualidade físico-química de produtos destinados a manipulação em farmácia magistral, exige a determinação da densidade aparente da matéria-prima utilizada para a produção de nutracêuticos/fitoterápicos, conforme a RDC 14/2010 (BRASIL, 2010). A densidade aparente encontrada para o nutracêutico Cacti-Nea<sup>TM</sup> foi de 0,63 g/mL, que está de acordo com a especificação do fabricante (mínimo 0,30 g/mL).

A determinação da umidade de um nutracêutico, disponibilizado sob a forma de pó, é um importante parâmetro a ser considerado, uma vez que esta umidade pode influenciar na estabilidade e aumentar o risco de contaminação microbiana do produto. A farmacopeia Brasileira (2010) determina, para este tipo de produto, valores inferiores a 14 % de umidade. Pelo ensaio com balança de infravermelho, foi observado que o nutracêutico em estudo apresentou 6,6 % de umidade, o que comprova a sua adequação à legislação.

Ainda dentro dos parâmetros de qualidade físico-química foram realizados os testes de determinação de cinzas totais e de cinzas insolúveis em ácidos. Por estes testes, é possível verificar se a matéria-prima usada na fabricação de um produto natural, usado para fim terapêutico, está contaminado com materiais inorgânicos, que possam desviar a qualidade do produto final (COUTO et al., 2009; LEITE, 2009). Os valores de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, encontrados no presente estudo, encontram-se dentro das especificações previstas pela Farmacopeia Brasileira (2010). Isso indica que as amostras não apresentavam contaminação por material estranho, como sílica e constituintes silicosos na matéria-prima vegetal (COUTO et al., 2009).

A determinação do teor de extrativos foi realizada de acordo com os parâmetros estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1998). O rendimento obtido neste estudo para os extrativos da Cacti-Nea<sup>TM</sup> foi de 19,23 %. Contudo, não há na literatura parâmetros pré-estabelecidos para esta avaliação, de modo que apesar de ser um dado

relevante na construção da qualidade do insumo, trata-se de um ensaio apenas de caráter informativo.

Os dados referentes à avaliação físico-química obtidos neste estudo são inéditos para este tipo de composto químico, visto a ausência de legislação, conferindo um dado adicional para a garantia da isenção de riscos à saúde de seu consumidor. Embora essa rotina não seja exigida pela legislação da área de alimentos, entende-se que estes testes devam ser adicionados às exigências laboratoriais de avaliação de registros de alimentos funcionais/nutracêuticos, uma vez que eles são usados como compostos para fins terapêuticos.

A análise da qualidade microbiológica tem a função de determinar a concentração, em unidades formadoras de colônia (UFC/g), de bactérias mesófilas, fungos e leveduras presente em uma amostra. A alta carga microbiana em um produto influencia o seu tempo de vida de prateleira, devido ao aumento da velocidade de sua deterioração. Agrega-se a esta análise a pesquisa e identificação de microrganismos patogênicos, tais como *Salmonella sp*, *E. coli*, *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *C. albicans* e bactérias Gram negativas bile tolerantes, que não devem estar presentes no produto, ou, se presentes, estes devem estar em quantidades limitadas (SIMÕES et al., 2007; FARMACOPEIA BRASILEIRA, 2010).

O resultado do controle microbiológico, realizado neste estudo com a Cacti-Nea™, demonstrou que as amostras deste nutracêutico estavam de acordo com as especificações da Farmacopeia Brasileira (2010), uma vez que foram encontrados MOs mesófilos em quantidades inferiores às especificadas pela legislação brasileira vigente. Quanto aos MO patogênicos, estes não foram observados em nenhum dos dos ensaios realizados.

## 5 CONCLUSÃO

A constante busca da população por alimentos funcionais demanda intensas pesquisas na área de alimentos funcionais/nutracêuticos. O nutracêutico Cacti-Nea™ apresentou todos os parâmetros avaliados (ensaios físico-químicos e microbiológicos) dentro das conformidades da legislação preconizada pela Farmacopeia Brasileira (2010). Os ensaios de atividade antimicrobiana e antioxidante, além de corroborar o potencial

promissor deste nutracêutico para fins terapêuticos, evidenciou um eficiente efeito citoprotetor, provavelmente derivado de compostos fenólicos presentes nos frutos de *O. ficus indica*, utilizados na produção deste nutracêutico.

## 6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANDEIRA, M.F.C. & et al. *Jornal Brasileiro de Clínica Estética e Odontologia*, 3(17): 47, 1998.

BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA, E. Agroecología, cultivo y uso del nopal. **Estudo FAO Producción y protección vegetal**. p. 132, 225, 1999.

BARRY, V.C.; O'ROURKE, L. & TWOMEY, D. Antitubercular activity of diphenil ether and related compounds. **Nature** 160: 800. 1947.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TRUCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. *The American Journal of Clinical Pathology* 45(4): 493-496. 1966.

BENZIANE, A., BOUTEKRABT, A., TOUATI, M., BAKRIA, T., TOUATI, A, BEZINI, E. Phenotypic diversity of *Opuntia ficus indica* (L.) MILL. in the Algerian steppe. **South African Journal of Botany**. 109. 66-74. 2017. DOI 10.1016/j.sajb.2016.12.024.

BISSON, JF; DAUBIÉ, S; HIDALGO, S.; GUILLEMET, D; LINARÉS, E. Diuretic and antioxidant effects of Cacti-Nea®, a dehydrated water extract from prickly pear fruit, in rats. **Phytother. Res.** 24: 587–594 (2010) Published online 23 September 2009 in Wiley InterScience (www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/ptr.2996.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução nº 14**, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília; 2010.

COUTO RO, VALGAS AB, BARA, MTF, PAULA JR. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Rev Eletronica Farm.** 2009;6(3):59-69

DE-SOUZA MM, GARBELOTO M, DENEZ K, EGER-MANGRICH I. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. **Rev. Bras. Farmacogn** 16: 365-371. 2006.

FALLER, A; FIALHO, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. 2010. 23:561–568.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 4ª ed. Parte 1-2. São Paulo: Atheneu Editora; 1988-2000.

GARCIA-AMOEDO, Luis Henrique; ALMEIDA-MURADIAN, Ligia Bicudo de. Comparação de metodologias para a determinação de umidade em geléia real. **Quím. Nova**, São Paulo, v. 25, n. 4, p. 676-679, July 2002. Available from <[http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0100-40422002000400024&lng=en&nrm=iso](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422002000400024&lng=en&nrm=iso)>. access on 26 Aug. 2018. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000400024>.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: University Press, 2007.

HENRIQUES, J. A. P.; DAFREÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. Espécies Reativas de Oxigênio e Avaliação de Antioxidantes em Sistemas Biológicos. In: **Biotecnologia na Agricultura e na Agropecuária**; Luciana Serafini, Neiva Barros e João Lúcio Azevedo (Ed.) Agropecuária, Instituto de Biotecnologia de Caxias do Sul. 2001.

KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WN, SCHRECKENBERGER PC, WINN JR WC. Antimicrobial susceptibility testing. In: **Color atlas and text book of diagnostic microbiology**. 5.ed. Philadelphia- New York: Lippincott. 1997.

LEITE JPV. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu; 2009.

LEO, M, BRUZUAL DE ABREU, M. PAWLOWSKA, AM., CIONI, L., BRACA, M. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus indica* flowers by HPLC-P-DA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. **Phytochemistry Letters** 3 (1), p48-52. 2010.

LIS-BACHIN M, DEANS SG. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **J Appl Bacteriol** 82: 759-762. 1997.

MARTINS AB, SACRAMENTO LVS. Análise microscópica e física para controle de qualidade primária de matéria prima vegetal pulverizada. In: 16º **Congresso de Iniciação Científica UNESP**, Ilha Solteira, Brasil; 2004.

MICHELIN DC, FINATI SCG, SACRAMENTO LVS, VILEGAS W, SALGADO HRN. Controle de Qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., Convolvulaceae. **Rev Bras Farmacogn.** 2010;20(1):18-22.

MIGLIATO KF, MOREIRA RD, MELLO JCP, SACRAMENTO LVS, SALGADO HRN. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev Bras Farmacogn.** 2007;17(1):94- 101.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

OLIVEIRA FP, LIMA EO, SIQUEIRA JÚNIOR JP, SOUZA EL, SANTOS BHC, BARRETO HM. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (Verbenaceae) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. Bras. Farmacogn** 16: 510-516. 2006b.

OLIVEIRA RAG, LIMA EO, VIEIRA WL, FREIRE KRL, TRAJANO VN, LIMA, IO, SOUZA EL, TOLEDO MS, SILVA-FILHO RN. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacogn** 16: 77-82. 2006a.

SILVA, A.L.L.; ARAUJO, M.G.S.; BASTOS, M.L.A.; BERNARDO, T.H.L.; OLIVEIRA, J.F.S.; SILVA-JUNIOR, E.F.; SANTOS-JUNIOR, P.F.S.; ARAUJO, M.V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; VERISSIMO, R.C.S.S. Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e antioxidante da espécie vegetal *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.307-315, 2016. DOI 10.1590/1983-084X/15\_145.

SIMÕES, CAM, SCHENKEL, EP, GOSMANN, G., MELLO, JCP, MENTZ, LA, PETROVICK, PR. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1102 p., 2007.

SOARES, DG; ANDREAZZA, AC.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* as a biological model to evaluate the antioxidant capacity of compounds. **Rev. Bras. Farm**, 85(2): 45-47, 2004.

STEVENSON D.E, HURST R.D. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? **Cell Mol Life Sci**. 2007. 64: 2900-2916.

WHO – World Human Organization. **Quality Control methods for medicinal plants materials**. Geneva; 1998.

ZARONI M, PONTAROLO R, ABRAHÃO WSM, FÁVERO MLD, CORREA JUNIOR C, STREMEL DP. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Rev Bras Farmacogn** 14: 29-39. 2004.

## Avaliação do potencial toxicogênico do nutracêutico Cacti-Nea™, por meio de bioensaios com *Allium cepa*

NAVARRO, F.F.<sup>1,2</sup>; CAMPOS-PEREIRA, F.D.<sup>1,3</sup>; ROBERTO, M.M.<sup>2</sup>; MARIN-MORALES, M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista - UNESP, Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Fundação Hermínio Ometto – UNIARARAS, Araras, SP, Brasil.

<sup>3</sup> Universidade Paulista – UNIP, Instituto de Ciências da Saúde, Limeira, SP, Brasil

### RESUMO

O consumo de produtos naturais e de alimentos funcionais, para o tratamento de desordens e manutenção da saúde, tem crescido exponencialmente. A espécie *Opuntia ficus-indica*, uma planta da família *Cactaceae* de origem mexicana, popularmente conhecida como figueira da Índia, é utilizada como alimento e na medicina popular. A Cacti-Nea™, um liofilizado de *O. ficus-indica*, é um nutracêutico com propriedades diuréticas e antioxidantes, especialmente indicado para o controle de peso corpóreo e proteção celular contra danos oxidativos ocasionados por radicais livres, que pode ser consumido em cápsulas ou em sachês. Diante do alto consumo e das poucas informações toxicogênicas deste produto, este estudo teve como objetivo realizar tanto uma avaliação fitoquímica preliminar como uma análise das atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas do nutracêutico Cacti-Nea™, por meio de bioensaios com *Allium cepa*. Para o estudo fitoquímico foram realizados ensaios qualitativos, quantitativos (polifenóis totais) e atividade antioxidante. A avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos foi realizada em células meristemáticas de *A. cepa*. Os resultados indicaram presença de flavonoides, saponinas e taninos, 614,4 mg de polifenóis totais  $\pm$  0,0052 e atividade antioxidante, para todas as concentrações avaliadas. Diversas concentrações induziram a inibição da germinação das sementes de *A. cepa* e as concentrações de 0,008; 0,006; 0,004 e 0,002 g/mL promoveram uma diminuição na divisão celular. Somente a concentração de 0,002 g/mL apresentou potencial mutagênico, resultado que foi corroborado pela avaliação dos danos genotóxicos nas células F1. Foi observado potencial genotóxico para as concentrações de 0,006; 0,004 e 0,002 g/mL, onde o MN a anormalidade de maior incidência. O sistema teste *A. cepa* foi um eficiente bioindicador utilizado neste estudo, se caracterizando como excelente teste para um primeiro screening de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do nutracêutico Cacti-Nea, devido à sua confiabilidade e ao seu baixo custo.

**Palavras-chaves:** alimento funcional, citotoxicidade, genotoxicidade, mutagenicidade; atividade antioxidante.

Artigo a ser encaminhado para Toxicology Letters ISSN: 0378-4274

## 1. INTRODUÇÃO

A atual preocupação de grande parte da população humana é quanto à ingestão de alimentos saudáveis. Uma alimentação saudável é aquela cujos alimentos contém todos os nutrientes necessários à saúde e que, conseqüentemente, oferecem uma boa qualidade de vida, por influenciar o bem-estar físico e mental, o equilíbrio emocional, a prevenção de distúrbios da saúde e como complementar aos tratamentos de doenças.

Diversas espécies vegetais têm sido estudadas quanto às suas propriedades nutracêuticas. A espécie *Opuntia ficus-indica*, uma planta da família *Cactaceae* de origem mexicana, popularmente conhecida como figueira da Índia, é utilizada tanto como alimento quanto na medicina popular (STINTZING; CARLE, 2005; MILLER, 2007; LEO *et al.*, 2010). De porte arbustivo, frutífero, amplamente cultivado nas regiões semi-áridas do mundo todo, apesar da sua enorme resistência a estiagem, surpreendentemente suas raízes não ultrapassam os 30 cm. Esta planta suculenta e ramificada, de porte arbustivo e de hábito perene, apresenta caules carnosos, no qual se inserem as suas flores e frutos (GONZALEZ; JARABO, 1990).

Na medicina popular, o uso dos seus frutos é indicado para a redução dos níveis de colesterol e da pressão arterial, assim como para o tratamento de úlceras, fadiga, debilidade hepática, afecções orais, psoríase, edema, dores musculares e reumáticas, conjuntivites, atividade cicatrizante e anti-inflamatória. Essa planta é ainda usada em formulações de cosméticos e na fabricação de ração animal (GALATI *et al.*, 2001; CUNHA, SILVA, ROQUE, 2003; VALENTE *et al.*, 2010).

A empresa Bio Serae Laboratories desenvolveu, a partir dos frutos de *O. ficus-indica*, um nutracêutico denominado de Cacti-Nea™, que apresenta, segundo a empresa, propriedades diuréticas e antioxidantes, especialmente indicado para o controle de peso corpóreo e para a proteção celular contra danos oxidativos ocasionados por radicais livres, podendo ser consumido em cápsulas ou em sachês (GALENA, 2006).

Apesar de *O. ficus-indica* ser uma espécie recomendada para consumo por possuir compostos bioativos e propriedades relacionadas à nutrição, à saúde e ao tratamento de doenças (EL-MOSTAFA *et al.*, 2014), não existem estudos para assegurar o consumo do produto comercial, quanto à sua toxicidade.

Popularmente, inúmeras espécies vegetais são utilizadas na prevenção e no combate a doenças, embora os estudos que comprovem a segurança em sua utilização, principalmente em usos subcrônicos e crônicos, sejam escassos. Diversos autores já evidenciaram ações citotóxicas e genotóxicas de compostos vegetais, que podem estar associadas ao desenvolvimento de tumores (AMES, 1983; SIMÕES et al., 2007; ELGORASHI et al., 2003).

O sistema-teste *Allium cepa* é recomendado para avaliações toxicológicas de inúmeras químicas, sendo validado como um bom bioindicador pela Organização Mundial da Saúde, pelo Programa Ambiental das Nações Unidas e pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos (MAURO et al., 2014). O referido bioindicador é utilizado e aceito para o estudo da toxicidade de plantas medicinais, sendo as alterações no ciclo celular e as alterações cromossômicas das células meristemáticas radiculares frequentemente usadas para alertar a população sobre a segurança de consumo de produtos usados na medicina popular (VICENTINI et al., 2001).

Os ensaios com *A. cepa* permitem avaliar, concomitantemente, a toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de determinados compostos, sejam estas amostras ambientais ou produtos naturais (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Apesar de serem recomendados testes com mamíferos, *in vivo* ou *in vitro*, o teste com *A. cepa* pode evidenciar, seguramente, os efeitos primários de produtos naturais, por apresentar baixo custo e alta sensibilidade e correlação com outros testes (teste de Ames e teste de carcinogenicidade em roedores – RANK; NIELSEN, 1994; sistema-teste com mamíferos – CHAUHAN et al., 1999; sistema-teste com linfócitos humanos – FISKESJÖ, 1985).

Contudo, um dos principais desafios na validação de fitoterápicos e seus compostos derivados é a toxicidade que essas substâncias podem apresentar. Sendo assim, é necessário que se esses produtos sejam bem avaliados por experimentos pré-clínicos (OBIRO; ZHANG; JIANG, 2008; PEREIRA et al., 2012), para a certificação de que não desencadeiam no consumidor reações adversas ao seu propósito.

A Cacti-Nea é apresentada na forma de suplemento alimentar, cuja indicação de dosagem varia de 500 a 2000 mg/dia. Os frutos de *Opuntia ficus indica*, são categorizados como alimento funcional, devido ao seu potencial terapêutico (EL-RAZEK et al., 2017;

PATEL, 2013). No entanto, nenhum dos trabalhos realizados com a Cacti-Nea, aborda uma avaliação toxicogenômica, desse nutracêutico.

Diante das evidências de alto uso da Cacti-Nea™ e dos poucos estudos toxicogenéticos realizados com esse conhecido nutracêutico, o objetivo do presente estudo foi realizar uma caracterização fitoquímica do produto comercial e avaliar suas atividades citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas, por meio de bioensaios com *Allium cepa*.

## 2 MATERIAIS E MÉTODOS

### 2.1. Materiais

A Cacti-Nea™, um nutracêutico a base de *Opuntia ficus-indica* produzido pela empresa Bio Serae Laboratories e comercializada pela Galena Química e Farmacêutica (lote 1608029502), foi avaliada neste estudo, quanto à sua caracterização fitoquímica e ao seu potencial toxicogenético, para diferentes concentrações que estão, devidamente, especificadas a seguir, na descrição de cada ensaio realizado.

A avaliação do potencial toxicogenético da Cacti-Nea™ foi realizada com as sementes de *Allium cepa* da marca ISLA® (variedade baia Periforme), adquiridas junto a Empresa ISLA®.

### 2.2. Caracterização fitoquímica

Para a caracterização fitoquímica do extrato seco do fruto de *O. ficus indica*, foram realizados testes clássicos de identificação dos principais grupos de princípios ativos (HARBONE, 1998; MELLO; PETROVICK, 2000 e FALKENBERG et al., 2003): flavonoides (reação de Shinoda, reação com cloreto férrico e reação com cloreto de alumínio); saponinas, cardiotônicos (reação de Liebermann-Burchard, reação de Balje, reação de Keller-Kiliani e reação de Kedde); antraquinonas, taninos (reação com gelatina, cloreto férrico e acetato de chumbo); e alcaloides (solúveis em meio ácido e meio básico: reações de Dragendorff, Bertrand, Valser-Mayer e Bouchardat). Para determinação das saponinas, foi averiguado o índice de espuma.

### 2.2.1. Determinação do teor de fenóis totais

Uma amostra equivalente a 0,750 g de extrato vegetal foi transferida para Erlenmeyer com 150 mL de água, para compor a solução mãe. Esta solução foi mantida, durante 30 min, em banho-maria à temperatura entre 80 e 90°C. Para a determinação de compostos fenólicos totais, 5,0 mL da solução mãe foram diluídos, em balão volumétrico de 25 mL, com água purificada. Em seguida, 2 mL dessa solução foram transferidos para um balão volumétrico de 25 mL, onde foram adicionados 1 mL de solução de ácido fosfotúngstico R (Reagente fenólico de Folin-Ciocalteu 2M) e 10 mL de água purificada. O volume do balão foi completado com solução de carbonato de sódio a 14,06 %. Após a adição da última solução e de um período de descanso de 30 minutos, foi medida a absorbância a 691 nm, utilizando água como branco (GLASL, 1983). O teor de fenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico por grama de amostra (MOYER et al., 2002).

### 2.3. Avaliação da atividade antioxidante

Para avaliação da atividade antioxidante, foi realizado o ensaio de atividade antioxidante com 2,2 difenil- 2-picril-hidrazil (DPPH). O DPPH é um radical livre estável com falta de um elétron em sua estrutura, usado para testar o potencial de doação de elétrons de outros compostos, como, os compostos fenólicos. Uma substância ao doar um elétron para o DPPH, faz com que este mude sua cor, permitindo o monitoramento da reação em espectrofotômetro.

O espectrofotômetro foi calibrado com metanol (MeOH), na faixa de absorbância de 517 nm. Foi construída uma curva de calibração pelo padrão de quercetina, que foi diluída em MeOH para a obtenção de diferentes concentrações (5,0; 10,0; 20,0; 40,0; 80,0 e 160,0 µg de quercetina/mL de metanol). As diferentes concentrações da amostra de Cacti-Nea™ e as soluções do padrão de quercetina foram submetidas ao mesmo protocolo: adição de 1,0 mL da amostra em 2 mL da solução de DPPH (4 mg de DPPH em 100 mL de MeOH). Após este procedimento, as amostras foram incubadas à temperatura ambiente, protegidas da luz, por 30 minutos. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 517 nm. Para a leitura do branco (Ao), foram adicionados 2 mL de solução de DPPH em 1 mL de MeOH (DENG; CHENG; YANG, 2011; SCHERER; GODOY, 2009). Os cálculos foram baseados na Equação 1:

$$\% \Delta = \frac{(A_0 - A)}{A_0} \times 100$$

Equação 1: Fórmula para determinação da atividade antioxidante.

Onde:  $\% \Delta$  = variação da absorbância.

$A_0$  = Absorbância do DPPH em metanol.

$A$  = Absorbância da amostra após 30 minutos de reação.

Os valores de absorbância obtidos foram plotados em um gráfico de variação da absorbância ( $\% \Delta$ ) pela concentração da amostra.

#### 2.4. Germinação das sementes de *Allium cepa*

Neste ensaio, foram utilizadas 100 sementes de *A. cepa*, da variedade Baia periforme, para a avaliação do potencial tóxico, citotóxico, genotóxico e mutagênico de diferentes concentrações do nutracêutico Cacti-Nea™. As 100 sementes foram submetidas à germinação em temperatura controlada  $22,0 \pm 2,0$  °C, em placas de Petri, contendo, individualmente, as diversas concentrações do nutracêutico Cacti-Nea™: 1,000; 0,500; 0,250; 0,120; 0,060; 0,030; 0,010; 0,008; 0,006; 0,004; 0,002 g/mL. O controle positivo foi realizado com o MMS (metil metanosulfonato - substância de ação clastogênica), na concentração de 10 mg/mL (RANK; NIELSEN, 1997) e o controle negativo com água ultrapura.

Após o período de exposição das sementes, foi determinado o potencial fitotóxico da Cacti-Nea™, pelo Índice de Toxicidade, obtido pelo cálculo da taxa das sementes germinadas. A partir deste índice, houve a seleção das concentrações de menor efeito tóxico, para serem utilizadas nas demais avaliações. Todo o experimento foi desenvolvido em duplicata.

#### 2.5. Confeção das lâminas de *A. cepa*.

Após a germinação das sementes, quando as radículas atingiram cerca de 1,5 cm de comprimento, elas foram coletadas e fixadas em Carnoy (3:1, v/v de etanol/ácido acético). Depois de fixadas, as radículas foram submetidas à hidrólise ácida em HCl 1N,

por 11 minutos, seguido pela exposição ao reativo de Schiff, para se estabelecer a reação de Feulgen (MELLO; VIDAL, 1978). As regiões meristemáticas e F1 das raízes foram seccionadas em lâmina e contra coradas com carmim acético a 2 %, para proporcionar uma melhor avaliação dos limites celulares. O material da lâmina foi suavemente esmagado entre lâmina e lamínula. As lamínulas foram extraídas em nitrogênio líquido e as lâminas montadas em resina sintética (Entellan®). O material foi analisado em a objetiva de 40X, em microscópio de luz (Olympus®, modelo CH40).

## **2.6. Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos em *A. cepa***

Para a avaliação dos potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico, foram analisadas 5.000 células meristemáticas para cada tratamento. O mesmo número de células foi analisado para o controle negativo e o controle positivo.

A citotoxicidade foi verificada pela análise de alterações celulares indicativas de morte celular (índice de citotoxicidade - ICit) e pela alteração no índice mitótico (IM), obtido segundo a equação:  $IM = (\text{número de células em divisão} / \text{número total de células observadas}) \times 100$ .

A avaliação da genotoxicidade foi baseada na quantificação das células portadoras de alterações cromossômicas ou nucleares, tais como C-metáfase, aderência cromossômica, anáfase e telófase multipolares, células com ponte e/ou perda cromossômica, broto nuclear, dentre outras. O índice de genotoxicidade (IGen) foi obtido pela fórmula:  $IGen = (\text{número de células portadoras de alterações cromossômicas e nucleares} / \text{número total de células observadas}) \times 100$ .

A análise do potencial mutagênico foi obtida pelo índice de mutagenicidade (IMut), dada pela frequência de ocorrência de células portadoras de micronúcleos (MN), calculado pela fórmula:  $IMut = (\text{número total de células com MN} / \text{número total de células observadas}) \times 100$ .

Ainda, com o intuito de verificar a possível fixação dos danos observados nas células meristemáticas, foram contabilizados os MN presentes em células da região F1 dos meristemas radiculares, para a determinação do índice de mutagenicidade (IMut-F1). Para a obtenção deste índice, seguiu-se a mesma fórmula mencionada o MN da região meristemática.

## 2.7. Testes estatísticos

Os valores obtidos após exposição às diferentes amostras foram comparados com os valores do controle negativo, bem como entre as amostras correspondentes, por meio de testes estatísticos adequados. Primeiramente, foi avaliado o padrão de distribuição dos resultados obtidos para cada um dos critérios de análise de toxicidade, por meio do teste de normalidade de D'Agostino & Pearson ( $p < 0,05$ ). Quando os resultados apresentaram distribuição normal, foi utilizado o teste paramétrico ANOVA um critério, seguido pelo teste de comparação múltipla de Holm-Sidak ( $p < 0,05$ ). Por outro lado, quando estes não apresentaram padrão normal de distribuição, foi utilizado o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn ( $p < 0,05$ ).

## 3. RESULTADOS

### 3.1. Caracterização fitoquímica

De acordo com a literatura, os frutos de *O. ficus-indica* são ricos em minerais e compostos fitoquímicos, os quais tornam este fruto um alimento funcional, que apresenta um potencial para seu emprego como nutracêutico (BISSON et al., 2010). Na Tabela 1 está apresentada a caracterização fitoquímica do nutracêutico Cacti-Nea™, no qual se pode observar a presença de metabólitos secundários do tipo flavonoides, saponinas e taninos bem como a ausência de antraquinonas e glicosídeos cardiotônicos.

Tabela 1: Caracterização fitoquímica do extrato de *Opuntia ficus-indica*, na forma comercial Cacti-Nea™.

Metabólitos secundários	Identificação de presença
Flavonoides	+
Saponinas	+ (espuma = 0,50±0,0023 cm)
Taninos	+
Alcaloides	-
Antraquinonas	-
Cardiotônicos	-

- ausência, + presença

### 3.2. Determinação do teor de fenóis totais

O teor de fenóis totais foi expresso em mg de ácido gálico por grama de extrato. Para quantificação foi realizada uma curva de calibração do ácido gálico ( $r^2 = 0,9914$ ), utilizada para a obtenção da equação da reta.

Para determinação do teor de fenóis totais, foram realizadas, em espectrofotômetro, leituras de 3 amostras distintas do extrato da Cacti-Nea™, o que gerou três valores, que foram aplicados na fórmula de calibração, conferindo um valor médio de 614,4 ±0,0052 mg/g.

### 3.3. Avaliação da atividade antioxidante

Segundo Moon e Shibamoto (2009), o método de avaliação de atividade antioxidante pelo DPPH é utilizado em mais de 90 % dos estudos, servindo para substâncias puras, misturas ou matrizes complexas. Para avaliação antioxidante pela técnica do DPPH, foram analisadas as concentrações de 0,002; 0,004; 0,006 e 0,008 g/mL de Cacti-Nea™, utilizando-se a quercetina como padrão para confecção da curva de calibração ( $r^2=0,9958$ ).

A Figura 1 apresenta os resultados obtidos pela avaliação da atividade antioxidante das concentrações testadas da Cacti-Nea™. Foi observado que a atividade antioxidante da Cacti-Nea™ é diretamente proporcional ao aumento da concentração do extrato do fruto de *O. ficus indica*.

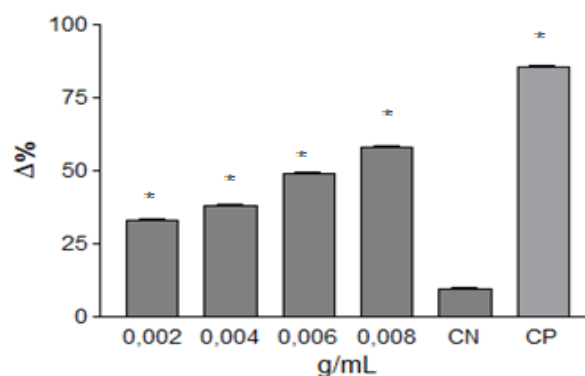


Figura 1: Resultados obtidos pela avaliação da atividade antioxidante de diferentes concentrações de Cacti-Nea™. \*  $p < 0.0001$  ANOVA, seguido do pos – teste de Tukey. CN: branco e CP: quercetina a 0,002 g/mL.

### 3.4. Avaliação dos efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos da Cacti-Nea™ pelo teste de *A. cepa*

O presente estudo traz resultados sobre a avaliação da toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do nutraceutico Cacti-Nea™, realizada com o organismo-teste *Allium cepa*.

Para avaliar o efeito tóxico da Cacti-Nea™, sementes de *A. cepa* foram expostas em 11 diferentes concentrações do nutraceutico. A Tabela 2 traz as taxas de germinação para as concentrações avaliadas.

Tabela 2: Taxa de germinação de sementes de *Allium cepa* expostas às diferentes concentrações de Cacti-Nea™.

Concentração (g/mL)	Taxa de Germinação (%)
1,000	0,00 ± 0,0000*
0,500	0,00 ± 0,0000*
0,250	0,00 ± 0,0000*
0,120	33,25 ± 0,0100*
0,060	62,10 ± 0,0170*
0,030	66,07 ± 0,0100*
0,010	72,08 ± 0,0660*
0,008	75,17 ± 0,0050*
0,006	83,24 ± 0,0020*
0,004	83,15 ± 0,0005*
0,002	83,21 ± 0,0020*
CP	35,70 ± 0,0084
CN	94,8 ± 0,0210

\*efeito tóxico (viabilidade < 75%); CN: controle negativo; CP: controle positivo; \* significativo em relação ao CN (ANOVA-Holm-Sidak –  $p < 0,05$ ).

Pelos resultados obtidos, é possível avaliar que as maiores concentrações testadas do nutracêutico foram as que apresentaram maiores efeitos tóxicos (1,000; 0,500; 0,250 g/mL - Tabela 2), o que levou a uma inibição total da germinação. Já as concentrações intermediárias (0,120; 0,060; 0,030; 0,010 g/mL) apresentaram efeitos tóxicos moderados, que ainda não foram satisfatórios para a continuidade das avaliações. As demais concentrações (0,008; 0,006; 0,004; 0,002) apresentaram índices de germinação

e iguais ou superiores a 75% e, portanto foram, selecionadas para serem utilizadas nas demais avaliações.

Como não houve registro de células com características de processo de morte, não serão apresentados resultados para este critério de avaliação, sendo apenas o índice mitótico (IM) considerado para o parâmetro de citotoxicidade. Assim, pode-se observar que as concentrações 0,002, 0,004, 0,006 e 0,008 g/mL induziram índices de divisão celular inversamente proporcionais à concentração testada (Figura 5 A).

Em relação ao critério de avaliação de genotoxicidade, conforme apresentado na Figura 5 (B), todas as concentrações avaliadas evidenciam o efeito genotóxico pela Cacti-Nea™.

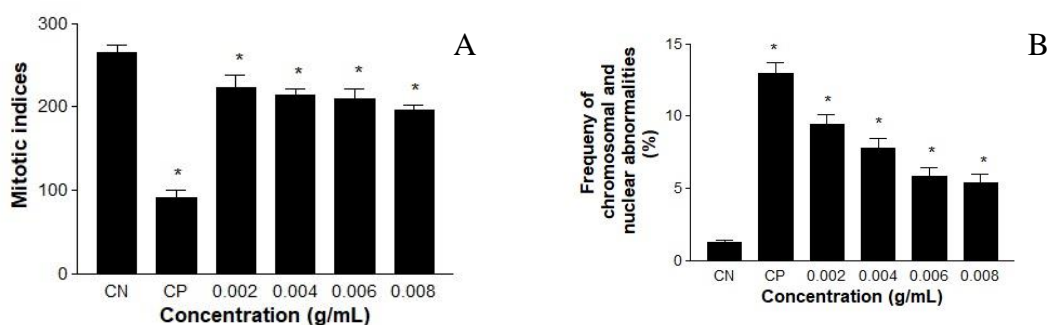


Figura 5: A: Índices mitóticos (IM) obtidos pela germinação de sementes de *Allium cepa* expostas a diferentes concentrações de Cacti-Nea™. B: Frequência de anormalidades cromossômicas e nucleares (IGen) obtida após a exposição de *Allium cepa* às diferentes concentrações de Cacti-Nea™. CN: controle negativo; CP: controle positivo; \* significativo em relação ao CN (ANOVA-Um critério/Holm-Sidak –  $p < 0,05$ ).

A Tabela 3 apresenta as frequências das alterações cromossômicas e nucleares observadas em células meristemáticas de *Allium cepa* expostas a germinação em diferentes concentrações de Cacti-Nea™. As principais anormalidades registradas nesta avaliação foram o broto nuclear e a ponte cromossômica.

Tabela 3: Frequência e desvios padrão das alterações cromossômicas e nucleares observadas em meristemas radiculares de *Allium cepa* expostos em diferentes concentrações de Cacti-Nea™.

	CN	CP	Concentração (g/mL)			
			0,002	0,004	0,006	0,008
Broto Nuclear	0,00 ± 0,00	0,43* ± 1,98	0,82* ± 0,10	0,52* ± 0,70	0,44* ± 0,79	0,34* ± 0,95
Célula Poliploide	0,00 ± 0,00	0,12 ± 0,98	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
Aderência Cromossômica	0,06 ± 0,89	0,14 ± 0,88	0,00 ± 0,00	0,03 ± 0,90	0,07 ± 0,92	0,05 ± 0,95
Ponte Cromossômica	0,02 ± 1,24	0,96* ± 0,10	0,80* ± 1,27	0,68* ± 0,85	0,56* ± 0,79	0,40* ± 0,82
Perda Cromossômica	0,04 ± 0,99	0,18 ± 1,48	0,29 ± 1,08	0,38 ± 0,85	0,31 ± 0,84	0,20 ± 0,87

Valores expressos em porcentagem (%). CN: controle negativo; CP: controle positivo. \* significativo em relação ao CN (ANOVA-Um critério/Holm-Sidak –  $p < 0,05$ ).

Em relação à avaliação de mutagenicidade nas células meristemáticas de *A. cepa*, as duas menores concentrações testadas (0,002 e 0,004 g/mL) de Cacti-Nea™ apresentaram potencial mutagênico (Figura 6A).

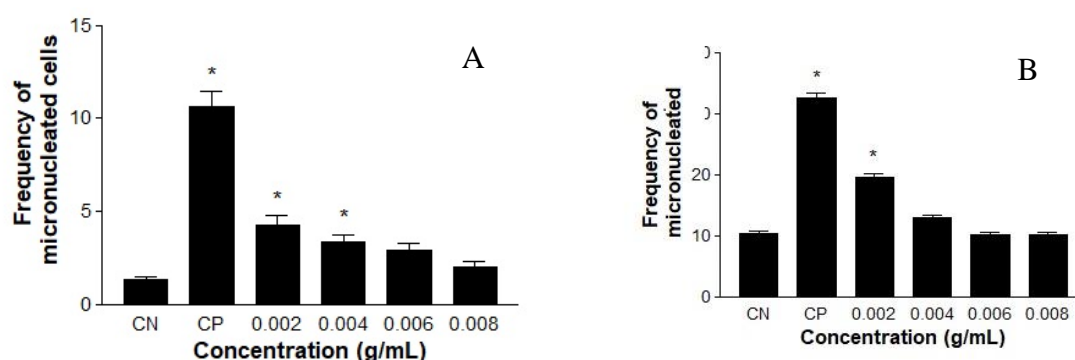


Figura 6: A: Frequência de células micronucleadas (IMut) obtida após a exposição de *Allium cepa* às diferentes concentrações de Cacti-Nea™. B: Frequência de células micronucleadas presentes na geração F1 (IMut-F1), obtidas após a exposição de *Allium cepa* às diferentes concentrações de Cacti-Nea™. CN: controle negativo; CP: controle positivo; \* significativo em relação ao CN (Kruskal-Wallis/Dunn –  $p < 0,05$ ).

Para a maior segurança na certificação do potencial mutagênico do nutracêutico Cacti-Nea™, foi também avaliada neste estudo, a frequência de células F1 portadoras de MN, conforme metodologia descrita por Ma et al.(1995). Pelas análises das células F1 de

A. *cepa*, é possível estimar se houve a fixação de danos genotóxicos (MN) induzidos pelo nutracêutico. Conforme apresentado na Figura 6 (B), somente a concentração de 0,002 g/mL apresentou potencial mutagênico, corroborando os resultados encontrados nas células meristemáticas.

#### 4. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Durante um longo período, os fármacos eram obtidos inteiramente de fontes naturais, derivados de plantas, animais e/ou matéria inorgânica. Atualmente, há no mundo, inclusive no Brasil, várias linhas de pesquisa que investigam novas terapias, tecnologias e fármacos para o tratamento de várias doenças, como a obesidade e o câncer. De acordo com Alvarenga et al.(2014), compostos obtidos em vegetais podem se caracterizar como alternativas inovadoras e alvos potenciais para o aprimoramento dessas novas terapias. Dentre estes compostos, a Cacti-Nea™ apresenta um potencial para ser utilizada como nutracêutico, auxiliando no combate de várias enfermidades, assim como no controle da obesidade.

A partir da caracterização fitoquímica da amostra comercial de *O. ficus-indica*, foi possível identificar alguns compostos polifenólicos no nutracêutico preparado com frutos desta planta. Outros estudos também demonstraram a presença de metabólitos secundários, como os polifenóis e polifenos totais (HARBONE; WILLIAMS, 2000), flavonoides, taurinas, saponinas, rutina e betalaína na espécie *O. ficus indica* (GALATI et al., 2003; TESORIERE et al., 2005; ISHURD et al., 2010) diversos estudos correlacionam a concentração de fenóis totais com a capacidade de sequestrar radicais livres (atividade antioxidante) (ISHURD et al., 2010).

Pelos resultados fitoquímicos preliminares aqui apresentados, foi possível observar que a dosagem de polifenóis do nutracêutico é superior aos níveis encontrados no fruto *in natura*, conforme demonstrado por Melgar et al.(2017). Estes autores quantificaram polifenóis totais em duas variedades de *Opuntia ficus-indica* (var. gialla e var. Sanguigna) e encontraram, valores de, 3,26 e 3,7 mg/g, respectivamente para elas, que ficaram muito abaixo dos 614,4 mg/g encontrados na Cacti-Nea™. Este dado pode ser justificado pela técnica de obtenção deste produto comercial, na qual os frutos são higienizados e prensados de modo a se obter o sumo. Na sequência, o sumo é clarificado, evaporado,

pasteurizado e associado a goma de acácia, para então ser transformado em pó pela técnica de *spray-dryer* (BISSON et al., 2010). Conforme observado, tal processamento tecnológico leva à um aumento da concentração dos ativos presentes no nutracêutico.

Os polifenóis são os metabólitos secundários vegetais mais estudados, pois são relacionados com a prevenção de danos ao DNA causados por agentes cancerígenos ou induzidos por radicais livres (GALATI et al., 2003; TESORIERE et al., 2005).

O estresse oxidativo é um evento relacionado a enzimas, como a glutathione peroxidase, glutathione reductase, lipoxigenase e xantina oxidase, cujas concentrações celulares podem ser alteradas em uma situação de desequilíbrio entre compostos oxidantes e antioxidantes (ALÍA et al., 2006; CURTI et al., 2017). Kunst et al.(2014) afirmam que o processo de morte celular, principalmente de forma programada, tem inúmeras funções nas plantas, tais como representar processos de senescência das células e os tecidos ou se apresentar como um mecanismo de defesa, contra um dano induzido no organismo.

Em uma avaliação dos sucos obtidos a partir dos frutos de nove espécies de *Opuntia* sp., Chavez-Santoscoy et al.(2009) observaram efeito citotóxico frente a linhagens de células cancerígenas de cólon e de próstata, o que corrobora com as observações obtidas no presente trabalho, onde algumas concentrações se mostraram citotóxicas para o organismo indicador *A. cepa*.

Os dados obtidos no presente estudo indicam que quanto maior a concentração das soluções de CactiNea™, menor é o índice mitótico, o que corrobora com trabalhos com os frutos de *O. ficus indica* (Chavez-Santoscoy et al.,2009). Ao avaliar o potencial genotóxico quanto maior a concentração dos tratamentos menor é o potencial genotóxico, com maior frequência de brotos e pontos cromossômicas.

O mesmo comportamento é observado na frequência de células micronucleadas, onde o dano fixado nas células F1. Desta forma pode-se sugerir que as concentrações da solução de Cacti-Nea™, diminuem o potencial de divisão celular, contudo estudos sobre as vias celulares envolvidas neste processo devem ser avaliadas.

Os dados também demonstraram que o sistema teste *Allium cepa* se caracterizou em um bioindicador eficiente para um primeiro screening de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do nutracêutico Cacti-Nea™, tanto pela confiabilidade do teste como pela

boa correspondência com sistemas teste de mamífero (RANK & NIELSEN, 1994; CHAUHAN *et al.*, 1999). Esse teste ainda tem a vantagem de ser de baixo custo, o que viabiliza a sua aplicação para os mais diversos fins. Desta forma, esse teste tem um bom potencial para ser aplicado em avaliações de possíveis riscos conferidos pelo consumo irracional de nutracêutico, sendo, conseqüentemente, também interessante para avaliação de toxicidade da Cacti-Nea™.

## 7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALÍA, M; MATEOS, R; RAMOS, S; LECUMBERRI, E; BRAVO, L; GOYA, L. Influence of Quercetin and Rutin on Growth and Antioxidant Defense System of a Human Hepatoma Cell Line (Hepg2). **Eur J Nutr** 2006. 45:19-28, 2006.

ALVARENGA, EC; CAIRES, A; LADEIRA, LO; GAMERO, EJP; ANDRADE, LM; PAZ, MTL; LEITE, MF. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, 66(1), 43-48. 2014.

AMES, BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**,v.221,.2,p. 1256-1264, 1983.

BISSON, JF; DAUBIÉ, S; HIDALGO, S.; GUILLEMET, D; LINARÉS, E. Diuretic and antioxidant effects of Cacti-Nea®, a dehydrated water extract from prickly pear fruit, in rats. **Phytother. Res.** 24: 587–594 (2010) Published online 23 September 2009 in Wiley InterScience(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/ptr.2996.

CHAUHAN LKS, SAXENA PN, GUPTA SK. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environ Exp Bot** 42: 181-189. 1999.

CHAVEZ-SANTOSCOY, RA; GUTIERREZ-URIBI, JA; SERNA-SALDIVAR, SO. Phenolic composition, antioxidante capacity and in vitro câncer cell citotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia sp*) juice. **Plant foods hum nutr.** 64:146-152. 2009. DOI: 10.1007/S11130-009-0117-0.

CUNHA, AP; SILVA, AP; ROQUE, OR. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia.**

Lisboa: Calouste Gulbenkian. 2003.

CURTI, V; DI LORENZO, A; DACREMA, M; XIAO, J; NABANI, SM; DAGLIA, M. In vitro polyphenol effects on apoptosis: an update of literature data. **J Sem Cancer** [on line].

2017. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.semancer.2017.08.005>.

DENG, J; CHENG, W; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay., **Food Chemistry** v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011. ISSN 0308-8146.

ELGORASHI EE, TAYLOR JLS, MAES A, VAN STADEN J, DE KIMPE N, VERSCHAEVE L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicol Lett** 2003;143:195-207.

EL-MOSTAFA, K.; EL-KHARRASSI, Y.; BADREDDINE, A.; ANDREOLETTI, P.; VAMECQ, J.; EL-KEBBAJ, M.S.; LATRUFFE, G.; NASSER, B.; CHERKAOUI-MALKI, M. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease, **Molecules, Basel**, v. 19, n. 9, p. 14879-14901, 2014.

doi:10.3390/molecules190914879.

EL-RAZEK, ABD; EL-METWALLY, FH; SHEHAB, M; HASSAN, GMG; AHMAD, AA; ZEENAT, W; AHMAD, F; ANSARI, M. Medicinal plants as potent diuretic: A review. **Int J Adv Pharm Med Bioallied Sci.** 2017; 2017:122.

FALKENBERG; M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES et al.(org). **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 6ed., Editora da UFSC, UFRGS Editora, 1104 p. 2007.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, vol. 102, no. 1, p. 99-112. PMID:3988545. 1985.

GALATI EM, MONDELLO MR, GIUFFRIDA D, DUGO G, MICELI N, PERGOLIZZI S, TAVIANO, MF. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. **J Agric Food Chem** 51:4903–4908. 2003.

GALATI, E. M.; MONFORTE, M. T.; TRIPODO, M. M.; D'ÁQUINO, A.; MONDELLO, M. R. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (*Cactaceae*): ultrastructural study. **Journal of Ethnopharmacology**, 83 (3), p. 229-233. 2001.

GALENA. Cacti-Nea™: Nutracêutico do fruto de *Opuntia ficus-indica* com ação diurética e antioxidante. Boletim Técnico. 2006.

GLASL, H. Zur Photometric in der Drogenstandardisierung- 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979-1987, 1983.

GONZALEZ, FJ, JARABO, SMM. La chumbera como cultivo de zonas áridas. Madrid. **Hojas Divulgadoras**. n.90, p. 24, 1990.

HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 52, p. 481-504, 2000.

HARBORNE, JB. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2nd ed. London: Chapman and Hill, 288 p. 1998.

ISHURD O, ZGHEEL F, ELGHAZOUN M, ELMABRUK M, KERMAGI A, KENNEDY JF, KNILL CJ. A novel (1 - 4)- $\alpha$ -D-glucan isolated from the fruits of *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. **Carbohydr Polym** 82:848–853. 2010.

KUNST, L.R.; GARCIA, M. V.; MACHADO, A. D.; BARBISAN, F.; SILVEIRA, A. F. Otacoustic emissions and biomarkers of oxidative stress in students of a tobacco-producing region. **CoDAS**. 26 (3): 322-329, 2014.

LEME, D.M., MARIN-MORALES, M.A. Allium cepa Test in Environmental Monitoring: A Review on Its Application. **Mutation Research**, 682, 71-81. 2009.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.mrrev.2009.06.002> PMID:19577002

LEO, M, BRUZUAL DE ABREU, M. PAWLOWSKA, AM., CIONI, L., BRACA, M. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus indica* flowers by HPLC-P-DA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. **Phytochemistry Letters** 3 (1), p48-52. 2010.

MA, T-H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, Amsterdam, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MAURO, M.O.; PESARINI, J.R.; MARIN-MORALES, M.A.; MONREAL, M.T.F.D.; MONREAL, A.C.D.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA, R.J. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture, **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 4808-4819, 2014.

MELGAR,B; DIAS, MI; CIRIC, A; SOKOVIC, M; GARCIA-CASTELLO, EM; RODRIGUEZ-LOPEZ, AD; BARROS, L; FERREIRA, I. By-product recovery of *Opuntia spp.* peels: Betalainic and phenolic profiles and bioactive properties. **Industrial Crops & Products** 107: 353–359. 2017.

MELLO JCP, PETROVICK PR. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (Asteraceae) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm Bonaer.** 2000;19(3):211-5.

MILLER W, ROSENBLOOM K, HARDISON RC, HOU M, TAYLOR J, RANEY B, BURHANS R, KING DC, BAERTSCH R, BLANKENBERG D, 28-way vertebrate alignment and conservation track in the UCSC Genome Browser. **Genome Res** 17: 1797–1808. 2007.

MOON, JK; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MOYER, R.A. et al.. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **J Agric Food Chem**, v.50, p.519-525, 2002.

OBIRO, WC; ZHANG, T; JIANG, B. The nutraceutical role of the *Phaseolus vulgaris* alpha – amylase inhibitor. **J. Nutr.**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2008.

PATEL, C., GARREC, J., DUPONT, C., AND DUMONT, E. What singles out the G[8-5]C intrastrand DNA cross-link? Mechanisticstructural insights from quantum

mechanics/molecular mechanics simulations. **Biochemistry** 52, 425–431. 2013. doi: 10.1021/bi301198h.

PEREIRA, CD; MARTÍN-DIAZ, ML; CATHARINO, MG; CESAR, A; CHOUERI, RB; TANIGUCHI, S; ABESSA, DM; BÍCEGO, MC; VASCONCELLOS, MB; BAINY, AC; SOUSA, EC; DELVALLS, TS. Chronic contamination assessment integrating biomarkers responses in transplanted mussels-a seasonal monitoring. **Environment Toxicology**. Springer, São Paulo, v.27, n. 5, 257-67, 2012.

RANK J, NIELSEN MH. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methane sulfonate. **Mutat Res**. 1997;390(1-2):121–127.

RANK, J, NIELSEN, M. A. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium test*. **Hereditas**, 1994: 121, no. 3, p. 249-254.

RANK, J, NIELSEN, M. A. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium test*. **Hereditas**, 1994: 121, no. 3, p. 249-254.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, n.3, p.654-8, 2009.

SIMÕES, CAM, SCHENKEL, EP, GOSMANN, G., MELLO, JCP, MENTZ, LA, PETROVICK, PR. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1102 p., 2007.

STINTZING FC, CARLE R. Cactus stems (*Opuntia spp.*): a review on their chemistry, technology, and uses. **Mol Nutr Food Res**. 2005 Feb;49 (2):175-94.

TESORIERE L, FAZZARI M, ALLEGRA M, et al.. Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of sicilian cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. **J Agric Food Chem**. 2005; 53(20):7851-5.

VALENTE, LMM; PAIXÃO, D; NASCIMENTO, AC; SANTOS, PFP; SCHEINVAR, LA; MOURA, MRL; TINOCO, LW; GOMES, LNF; SILVA, JFM. Antiradical activity, nutritional

potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). **Food Chemistry**, 123(4), 1127-1131. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.074>.

VICENTINI, V.E.P.; CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M.S. Averrhoa carambola L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, p. 593-598, 2001.

## Avaliação *in vitro* dos efeitos toxicogênicos do nutracêutico Cacti-Nea™

NAVARRO, F.F.<sup>1,2</sup>; CAMPOS - PEREIRA, F.D.<sup>1</sup>; GONÇALVES, L.C.<sup>1,2</sup> ROBERTO, M.M.<sup>2</sup>; MARIN-MORALES, M.A.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biologia, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Rio Claro, SP, Brasil.

<sup>2</sup> Centro Universitário Hermínio Ometto – UNIARARAS, Araras, SP, Brasil.

### RESUMO

O nutracêutico Cacti-Nea™ é produzido a partir dos frutos da espécie *Opuntia ficus-indica*, sendo indicado para o controle de peso e proteção celular contra danos oxidativos ocasionados por radicais livres. O objetivo deste estudo foi quantificar os teores de betalainas e avaliar o potencial citotóxico, genotóxico, mutagênico e de indução de estresse oxidativo da Cacti-Nea™ na linhagem celular HepG2. Foram realizados os ensaios de quantificação de betalainas, de viabilidade celular (MTT), do ensaio cometa, do teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (MN), do índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) e de estresse oxidativo, para as enzimas SOD, GST e GSH e para as espécies reativas não enzimáticas TBARS. Os resultados indicaram que as maiores concentrações testadas do nutracêutico apresentaram um potencial citotóxico para a células HepG2, teste este (MTT) que serviu para selecionar as concentrações a serem utilizadas nos demais testes. Nenhuma concentração testada nos testes do cometa e do MN apresentaram potencial genotóxico e mutagênico. Os ensaios de IPBC, mostraram haver um padrão concentração inversamente-dependente de ação antiproliferativa celular. As concentrações estudadas não alteraram os mecanismos de defesa antioxidante das células, com exceção do sistema enzimático GST, indicando uma provável via metabólica de detoxificação do nutracêutico. Os resultados obtidos neste estudo sugerem um possível potencial antiproliferativo para este nutracêutico. Contudo, para a comprovação desta ação, há necessidade de realização de mais estudos com esse nutracêutico, que devem ser realizados tanto em testes *in vivo* como *in vitro*.

**Palavras-chaves:** células HepG2, teste do micronúcleo, ensaio cometa, estresse oxidativo, etnomedicina.

Artigo a ser encaminhado para Food and Chemical Toxicology. ISSN: 0278-6915

## 1. INTRODUÇÃO

Alimentos funcionais e nutracêuticos têm despertado a atenção tanto dos profissionais da área da saúde como da população, devido ao seu potencial terapêutico. O fruto de algumas espécies de cactos se mostram candidatos promissores para uso medicinal, devido à sua composição rica em minerais, fibras e compostos antioxidantes. Dentre as espécies da família Cactaceae, *Opuntia ficus indica*, popularmente conhecida como palma-forrageira ou figueira da Índia (LEO et al., 2010) e seus frutos como nopal, figo da Índia e maçã cacto (PATEL, 2013), é usada como alimento pelos indígenas dos EUA e pela população mexicana. Seu emprego, contudo, não se restringe a alimentação, mas também a etnomedicina, sendo usada como anti-inflamatório, antiasmático, diurético, cardiotônico e para tratamentos de úlceras e diabetes (WOLFRAM et al. 2003; ENNOURI et al., 2006; CHIACCHIO et al., 2006). Almeida Neto et al. (2005), em seus estudos realizados com ratos, observaram que esta planta não apresenta potencial mutagênico.

Os frutos de *O. ficus indica* entram na categoria de alimentos funcionais, devido ao seu reconhecido potencial terapêutico (EL-RAZEK et al., 2017; PATEL, 2013). Embora haja descrições de indicação de uso desses frutos como agentes protetivos contra distúrbios fisiológicos, tais como efeito citoprotetor (GALATI, et al., 2003), hepatoprotetores (GALATI, et al., 2005) e protetor do tecido endotelial (GENTILI et al., 2004), González-Ponce et al. (2018) já evidenciaram uma ação antiproliferativa para vários tipos de células tumorais.

A Cacti-Nea™ é um desidratado de extrato aquoso de frutos de *O. ficus indica*, que se apresenta sob a forma de pó de coloração âmbar a vermelho, solúvel em água e naturalmente rico em betalaínas (BISSON et al., 2010). Até o momento, não existe nenhum estudo que investigue e ou comprove o potencial toxicogênico de produtos comerciais derivados do fruto de *O. ficus indica*.

Alguns autores evidenciaram ações citotóxicas, genotóxicas e mutagênicas de compostos vegetais, que podem estar associados ao desenvolvimento de tumores (AMES, 1983; ELGORASHI et al., 2003; ALMEIDA-NETO et al., 2005; SIMÕES et al. 2007).

Os produtos de plantas, utilizados na medicina popular, muitas vezes são considerados seguros, porém, eles não estão livres de desencadear efeitos adversos ao seu consumidor, principalmente em longo prazo. Muitos efeitos tóxicos podem não ser detectáveis de imediato, portanto, de difícil correlação com a sua causa. Dentre os efeitos

que se instalam em longo prazo, estão os induzidos por agentes carcinogênicos (ERNEST, 2000; SCHULZ et al., 2002; DE-ALMEIDA et al., 2005; WHO, 2007). Por esta razão, Almeida-Neto et al.(2005) sugerem que os produtos naturais usados para fins terapêuticos, devam também passar por uma avaliação toxicogenética, para uma melhor investigação de seus possíveis efeitos adversos.

Para a avaliação toxicogenéticas, os ensaios do cometa e do micronúcleo (MN) são os mais utilizados. Esses testes, além de serem recomendados para a investigação das características genotóxicas de um agente químico, também são indicados para certificação de inoquidade para a obtenção de registro de novos produtos químicos, que entram anualmente no mercado mundial (SBMCTA, 2004).

O ensaio do cometa permite evidenciar danos genotóxicos, em células individuais (LEE;STEINERT, 2003), como quebras de fita simples ou dupla na molécula de DNA e danos oxidativos em células eucarióticas (SINGH, et al., 1988; FAIRBAIRN; OLIVE; NEILL, 1995). Este teste também responde a quebras no DNA promovidas pelo próprio mecanismos de reparo da célula (WHITE & RASMUSSEN, 1998). Complementando o ensaio do micronúcleo (MN) é indicado para avaliar o potencial mutagênico de um agente. Por isso, os produtos comercializados derivados de vegetais, como a Cacti-Nea™, devem passar pelos testes do cometa e do MN, antes de serem disponibilizados para a população em geral (DE-ALMEIDA et al., 2005).

Outra análise que vem sendo utilizada para avaliar efeitos adversos de compostos químico de diversas origens é a de indução do estresse oxidativo (EO). Essa análise, avalia a formação de espécies reativas (ERs), que excedem a capacidade de defesa antioxidante e de reparo da célula (SIES, 1985), que tem como consequência o aumento de danos nas biomoléculas celulares (DNA, lipídios, proteínas). Tais danos, quando não corrigidos, comprometem o funcionamento da célula, contribuindo para processos patológicos e de envelhecimento ou ainda de indução de morte celular por apoptose ou necrose (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006; MARQUES; MARREIRO, 2006).

Este estudo teve como objetivo realizar a quantificação de betalainas, avaliar os potenciais citotóxico, genotóxico e mutagênico bem como a possível indução de estresse oxidativo pelo nutracêutico Cacti-Nea™, por meio de análises realizadas, *in vitro*, com a linhagem celular HepG2.

## 2. METODOLOGIA

### 2.1 Bioensaios com linhagem celular

Os bioensaios *in vitro* foram desenvolvidos com células de hepatocarcinoma humano (HepG2 - ATCC® HB-8065™), obtidas junto ao Banco de Células do Rio de Janeiro. O cultivo celular foi realizado em meio MEM (Meio Mínimo Essencial de Eagle), suplementado com 10 % de soro bovino fetal. Os frascos de cultivo celular (25 cm<sup>2</sup>), com ventilação, foram mantidos em temperatura controlada de 37 °C, em estufa de CO<sub>2</sub> (5 %) e umidade de 80 %.

### 2.2 Nutracêutico avaliado

Para realização deste estudo, foi utilizado o nutracêutico comercial denominado Cacti-Nea™, um desidratado de extrato aquoso de frutos de *Opuntia ficus indica*, comercializado pela distribuidora Galena Farmacêutica® sob lote de no. 1608029502, com validade 28/11/2018. Para a realização dos bioensaios, a escolha das concentrações foi estipulada pelo informe técnico fornecido pela distribuidora do nutracêutico (Galena Farmacêutica®). Todas as concentrações estudadas foram preparadas com meio de cultura MEM, no momento da realização dos bioensaios.

### 2.3 Quantificação de betalainas presentes no nutracêutico Cacti-Nea™

A concentração total dos pigmentos da classe das betalainas contidos na Cacti-Nea™ foi avaliada de acordo com Cai et al.(2001). Para esta análise, foram realizadas diluições do nutracêutico em uma mistura de metanol e água (80:20 v/v), de modo a obter um valor de absorção entre 0,9>A>1,0. A leitura da solução foi feita em espectrofotômetro Bel UV M51 (Biovera®). Os comprimentos de ondas utilizados para as quantificações de betaxantinas e betacianinas, obtidas pela aplicação da lei de Beer – Lambert, foram os de 484 e 535 nm, respectivamente.

#### 2.4 Teste do MTT, para avaliação da viabilidade de células HepG2 ao nutracêutico Cacti-Nea™

A determinação da citotoxicidade da Cacti-Nea™ para as células HepG2, foi feita pelo teste do MTT (Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide - CAS n. 298-93-1, Sigma), de acordo com o protocolo estabelecido por Mosmann (1983), com algumas modificações. O teste foi realizado em placas de 96 poços. Com poços identificados como branco, foi adicionado somente meio de cultura. Nos demais poços, foram semeadas  $2,34 \times 10^4$  células da linhagem HepG2/poço, completando o volume do poço para 100 µL de meio MEM, suplementado com soro bovino fetal (10 %). A placa foi incubada por um período de 24 h. Transcorridas as 24 h, o meio foi retirado e adicionado os tratamentos (200 µL por poço), preparados com as diferentes concentrações do nutracêutico Cacti-Nea™ (0,03; 0,01; 0,008; 0,006; 0,004 e 0,002 g/mL). O controle negativo (CN), foi realizado com meio de cultura sem soro e o controle positivo (CP) com solução de Triton X-100 (1 %).

As placas foram incubadas por 24 h, ao término da incubação, os tratamentos foram retirados dos poços e adicionados 150 µL de MTT ( $1 \times 10^{-6}$  mg/mL). A placa foi incubada, novamente, por 4 h, e, na sequência, a solução de MTT foi descartada, para ser adicionado, em cada poço, 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO).

A leitura foi realizada em espectrofotômetro com leitor de microplaca (Multiskan FC – Thermo Scientific), filtro de 540 nm. Para dar o prosseguimento nos demais ensaios (MN, cometa e de estresse oxidativo), foram selecionadas as concentrações que apresentaram viabilidade superior a 80%.

#### 2.5 Ensaios de genotoxicidade, mutagenicidade

Para os ensaios de genotoxicidade e de mutagenicidade, as células HepG2 foram expostas às concentrações de 0,006, 0,004 e 0,002 g/mL do nutracêutico, determinadas previamente pelo teste do MTT. O controle negativo foi realizado com meio MEM, associado a 50 µL de PBS e o controle positivo com 50 µL da solução de MMS ( $4 \times 10^{-4}$  M). Os tratamentos foram realizados em triplicata, por um período de 24 horas. Os resultados obtidos foram comparados com o CN.

## 2.6 Avaliação da genotoxicidade do nutracêutico da cacti-Nea<sup>TM</sup> pelo ensaio do cometa

O ensaio do cometa, realizado para avaliar o potencial genotóxico do nutracêutico, foi feito de acordo com o protocolo estabelecido por Singh et al.(1988) e Tice et al.(2000), com algumas modificações. Foram semeadas  $5 \times 10^5$  células por frasco de cultura de 25 cm<sup>2</sup>. Os frascos foram incubados por um período de 24 h, para estabilização das células. Em seguida, as células foram expostas por 24 horas aos tratamentos. Ao término da incubação, as células foram coletadas para avaliação do potencial citotóxico e genotóxico do nutracêutico. As suspensões celulares, obtidas da cultura, foram submetidas ao ensaio de viabilidade celular com o azul de Trypan (Gibco). Para esta avaliação, foram misturados, em criotubos, 20 µL da suspensão celular com 20 µL de Azul de Trypan, de acordo com a metodologia descrita por Salvadori et al.(2003). Foram quantificadas 100 células por tratamento, a fim de se obter o percentual de células vivas (brancas) e de células mortas (azuis).

Ao finalizar a contagem da viabilidade celular, 20 µL de cada suspensão celular foram misturados com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão a 37 °C, para a realização do ensaio do cometa. A mistura foi disposta em lâminas, previamente revestidas com agarose normal, e recobertas com lamínula. A remoção das lamínulas ocorreu após o resfriamento das lâminas a 4 °C por, aproximadamente, 15 minutos, tempo este necessário para a total solidificação do gel. Em seguida, as lâminas foram expostas à solução de lise (1 mL de Triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise estoque), no escuro, a 4 °C, por um período mínimo de 1 hora. Posteriormente, as lâminas foram transferidas para cuba de eletroforese e recobertas com tampão alcalino (NaOH 300 mM + EDTA 1 mM, com pH>13) a 4 °C, por 20 minutos, para a deselicoidização do DNA. A seguir, as lâminas foram submetidas a eletroforese a 39 V, 300 mA (~0.8 V / cm), durante 20 minutos. Transcorrido esse tempo, as lâminas foram neutralizadas com tampão Tris (0,4 M cloridrato de Trizma, pH 7,5) e fixadas em etanol absoluto. As lâminas foram armazenadas a 4 °C, até o momento da análise. As análises microscópicas foram realizadas em microscópio de epifluorescência Leica, filtro B - 3 4 (excitação:  $\lambda = 420 \text{ nm} - 490 \text{ nm}$ , barreira:  $\lambda = 520 \text{ nm}$ ), por meio da adição de 50 µL de GelRed® (15 µL de GelRed 10.000X em água, 5 mL de NaCl a 1M, e 45 mL de água destilada). Foram analisados, ao acaso, em objetiva de 40 x, 100 nucleóides por frasco (duas lâminas com 50 nucleóides cada), e 3 frascos por tratamento, totalizando 300 nucleóides/tratamento. Os danos no DNA foram estimados baseados na intensidade

de DNA, medida pelo software Comet Assay IV. Os resultados foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e, de acordo com a distribuição dos dados, realizado o teste estatístico paramétrico ANOVA ( $p < 0,05$ ) pos hoc Dunnet.

#### *2.6.1 Avaliação do potencial mutagênico da Cacti-Nea™ pelo ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese*

O ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (MNBC), foi desenvolvido de acordo com o protocolo descrito por Natarajan e Darroudi (1991), com algumas modificações. Foram semeadas  $1 \times 10^6$  células em frascos de cultura 25 cm<sup>2</sup>, que foram mantidos, para estabilização, por 24 h. Após este procedimento, foi realizada a avaliação de mutagenicidade, pelas células expostas aos tratamentos com as diferentes concentrações de Cacti-Nea™, por 24 horas. Decorrido este período, as células foram lavadas com PBS, o meio foi trocado e adicionado 3 µg/mL de citocalasina B (CitoB). Os frascos permaneceram neste tratamento, por 28 horas, para obtenção de células binucleadas. Em seguida, as células foram coletadas, tratadas com solução hipertônica de citrato de sódio (0,01 %), fixadas com formol (40 %) e Carnoy. Para o preparo das lâminas, as células foram centrifugadas e a suspensão celular ressuspensa em 0,5 mL de Carnoy e gotejada sobre lâminas com um filme de água gelada (4 °C). As lâminas foram secas em temperatura ambiente e coradas com Giemsa 5 % por 8 minutos.

As análises do ensaio do MN foram realizadas em microscopia de luz (objetivo de 100x), contabilizando 2.000 células binucleadas por frasco (duas lâminas com 1.000 células binucleadas cada), totalizando 6.000 células por tratamento. Dentre as células analisadas, foram consideradas, as células binucleadas normais e as células binucleadas portadoras de MN, pontes nucleoplasmáticas e/ou brotos nucleares. Os critérios utilizados para essas análises foram os descritos por Fenech et al. (2000), onde são selecionadas células binucleadas com integridade das delimitações nucleares e citoplasmáticas, núcleos de tamanhos similares não sobrepostos e com o mesmo padrão e intensidade de coloração.

#### *2.6.2 Alteração Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC)*

Outra avaliação realizada com as culturas celulares submetidas aos diferentes tratamentos com Cacti-Nea™ e expostas à CitoB foi pelo Índice de Proliferação com

Bloqueio de Citocinese (IPBC). Este índice, baseia-se na contagem de 500 células para cada um dos frascos/tratamento (totalizando 1500 células/tratamento), indicando o número médio de ciclo celulares que as células passaram, durante o período de exposição à CitoB. O IPBC é, de acordo com a OECD 487 (2012), utilizado para calcular a proliferação celular, cuja fórmula está apresentada a seguir:

$$IPBC = \frac{M1 + (2 \times M2) + (3 \times M3)}{N}$$

Onde:

M1 = células com 1 núcleo;

M2= células com 2 núcleos;

M3 = células com multinucleadas;

N = número de células analisadas (OECD 487, 2012).

Os resultados obtidos neste ensaio foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro Wilk e a análise de significância foi realizada pelo teste estatístico paramétrico ANOVA ( $p < 0,05$ ) pos hoc Dunnet, comparando os resultados nas células tratadas com os resultados do CN.

### 2.6.3 Avaliação de indução de estresse oxidativo pelo nutraceutico Cacti-Nea™

Os ensaios de estresse oxidativo foram realizados para mensurar as atividades das enzimas de estresse oxidativo Superóxido Dismutase (SOD), Glutathione-S-Transferase (GST), além dos níveis de Glutathione reduzida (GSH) e do nível de peroxidação lipídica (TBARS) induzidos, em células HepG2, após tratamentos realizados com o nutraceutico Cacti-Nea™. Foram semeadas  $1 \times 10^6$  células em frascos de cultura, que foram estabilizadas por 24 horas em estufa de CO<sub>2</sub> e expostas, posteriormente, às concentrações de 0,006; 0,004 e 0,002 g/mL de Cacti-Nea™. Após esse período, as células foram lavadas com PBS gelado, retiradas dos frascos com o auxílio de “scrapper”, transferidas para criotubos de 1,5 mL e armazenadas em nitrogênio líquido (LN<sub>2</sub>), para análises posteriores.

Para a realização dos ensaios, as células foram retiradas do N<sub>2</sub>, colocadas em recipiente com gelo e sonicadas em PBS, numa frequência de 25 %, durante, aproximadamente, 10 segundos, por duas vezes, no aparelho SonicatorQSonica®. As

análises (n=3) referentes aos ensaios de EO foram realizadas em placas de 96 poços e os valores quantificados em espectrofotômetro (Infinite® M200 Pró – Tecan).

#### 2.6.3.1 Avaliação da Atividade da Enzima Superóxido Dismutase (SOD)

A atividade da SOD foi avaliada pelo método de auto-oxidação do pirogalol, descrito por Marklund e Marklund (1974), com algumas modificações. O ensaio foi realizado com 20 µL da suspensão celular sonicada, 200 µL de tampão TRIS- HCl 25 mM com EDTA 1 mM, pH 8,5 e 20 µL de pirogalol 15 mM, incubados a 25°C, durante 10 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 200 µL de HCl 1N e mensurada em espectrofotômetro a 440 nm. A atividade foi expressa em unidades de absorvância/minuto.

#### 2.6.3.2 Avaliação da atividade da Glutathione-S-Transferase (GST)

A avaliação da atividade da GST seguiu o método de Habig et al.(1974), com algumas modificações. Neste ensaio, 20 µL da suspensão celular sonicada, foi misturada a 200 µL de tampão fosfato 0,1 M, pH 7.4, 30 µL de GSH 0,1 mM e 20 µL de CDNB (1-cloro-2,4-dinitrobenzeno) a 0,1 mM. A leitura da absorvância desta mistura foi monitorada, minuto a minuto, por um período total de 5 minutos em espectrofotômetro (Infinite® M200 Pró – Tecan 340 nm) e o resultado expresso em absorvância/ minuto.

#### 2.6.3.3 Avaliação da atividade da Glutathione reduzida (GSH)

Para a análise da GSH, foram misturados 200 µL da suspensão celular sonicada em um mesmo volume de ácido tricloroacético 20 % (TCA), contendo 1 mM EDTA. A mistura permaneceu em repouso por 5 minutos a temperatura ambiente, para precipitação das proteínas, e, em seguida, foi centrifugada, por 5 minutos, a 4.500 rpm. Foi retirada do sobrenadante uma alíquota de 100 µL, que foi adicionada a 100 µL de tampão TRIS- HCl 25 mM com EDTA 1 mM (pH 8,2) e, por último, 20 µL de DTNB 10 mM (5-5'-dithiobis- (2-nitrobenzoic acid)) (ELLMAN ,1959). A absorvância (Abs) foi monitorada, em espectrofotômetro, imediatamente após a adição do DTNB e, depois de 15 minutos da exposição, em 412 nm. A concentração de GSH foi calculada pela equação abaixo, proposta por Allameh et al.(1997):

$$(Abs_{final} - Abs_{inicial}) \times 157(mM)$$

#### 2.6.3.4 Determinação dos níveis de peroxidação lipídica (Espécies Reativas ao Ácido Tiobarbitúrico - TBARS)

A determinação da quantidade de TBARS seguiu o protocolo proposto por Buege e Aust (1978), com modificações. Foram utilizados 800 µL de suspensão celular sonicada, 1 mL de ácido tiobarbitúrico (TBA) 0,67 %, 10 µL de NaOH 10 M e 500 µL de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 20 %. A mistura foi submetida a banho-Maria por 15 minutos e resfriada em gelo. Na sequência, foram adicionados 1,5 mL de n-butanol. Para a extração do cromógeno, a mistura foi vigorosamente agitada e centrifugada por 5 minutos a 3500 rpm, para a separação da fase orgânica. A leitura da absorbância da fase aquosa foi feita em espectrofotômetro (Infinite® M200 Pró – Tecan a 535 nm) e a concentração de TBARS foi calculada usando  $\lambda_{535} = 149.000 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

#### 2.6.3.5 Análise estatística do estresse oxidativo

Todos os resultados obtidos nas análises de estresse oxidativo foram submetidos ao teste de normalidade Shapiro-Wilk e, posteriormente, ao teste ANOVA com pos hoc Dunnet ( $p < 0,05$ ). Os resultados dos tratamentos foram comparados com os do CN.

### 3. RESULTADOS

#### 3.1 Quantificação de betalainas presentes no nutraceutico Cacti-Nea™

A concentração das betalainas totais e das betaxantinas e betacianinas presentes no nutraceutico Cacti-Nea™, estão apresentados na Tabela 1. Como pode ser observado, as betaxantinas correspondem a cerca de 80% das betalainas totais.

Tabela 1: Concentração de betalainas totais e das betaxantinas e betacianinas no nutraceutico Cacti-Nea™

Quantificação	% (g/100g de Cacti-Nea™)
Betalainas totais	0,074 ± 0,0884
Betaxantinas	0,059 ± 0,0774
Betacianinas	0,015 ± 0,0995

#### 3.2 Teste do MTT

A citotoxicidade de diferentes concentrações da Cacti-Nea™ (0,03; 0,01; 0,008; 0,006; 0,004; 0,002 g/mL), para as células HepG2, foi estimada pelo teste de viabilidade celular do MTT. Foi observado que as concentrações 0,006; 0,004 e 0,002 g/mL apresentaram viabilidade celular superior a 80% (Tabela 2), sendo indicadas para o prosseguimento dos ensaios do cometa, do MN e de análise de EO.

Tabela 2: Viabilidade celular de células HepG2 expostas a diferentes concentrações de Cacti-Nea™.

Concentração de Cacti-Nea™ (g/mL)	Viabilidade (%)
CP	1,2 ± 0,03051
CN	99,7 ± 0,0056
0,03	64,07 ± 0,0965
0,01	67,85 ± 0,0464
0,008	78,14 ± 0,0328
0,006	82,68 ± 0,0521
0,004	84,57 ± 0,0236
0,002	86,77 ± 0,0321

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo

### 3.3 Avaliação da genotoxicidade do nutracêutico da cacti-Nea™ pelo ensaio do cometa

Foi avaliado, pelo ensaio do cometa, o potencial de indução de danos primários (quebras no DNA) pela Cacti-Nea™ sobre o DNA de células HepG2, expostas à diferentes concentrações desse nutracêutico (0,002; 0,004 e 0,006 g/mL). Como pode ser observado na tabela 3, não houve diferença estatisticamente significativa entre os tratamentos e o CN.

Tabela 3: Avaliação da genotoxicidade pelo ensaio do cometa de diferentes concentrações de Cacti-Nea™, para células HepG2

Concentração de Cacti-Nea™ (g/mL)	Intensidade de Cauda
CP	55,4644 ± 4,5411*
CN	10,3092 ± 1,7175
0,006	12,7377 ± 2,1220
0,004	15,2094 ± 1,8530
0,002	16,1070 ± 1,9122

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo, \*diferença significativa ( $p < 0,05$ ) quando comparada ao CN

### 3.4 Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese

Pelo teste de MN em células HepG2, foi possível observar que o nutracêutico não apresentou efeito mutagênico para nenhuma das concentrações estudadas (Figura 1).

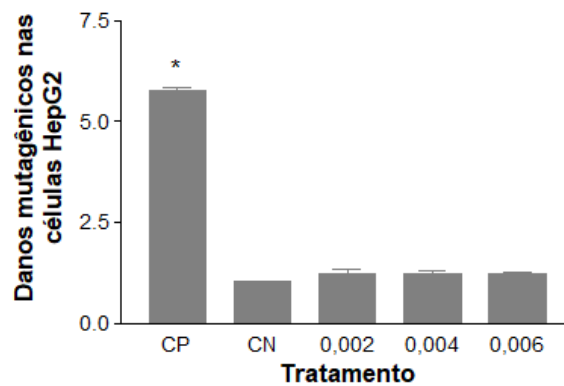


Figura 1: Frequências de anormalidade nucleares e de micronúcleos (MN) observadas em células HepG2, expostas a diferentes concentrações de Cacti-Nea™. CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo, tratamento em g/mL, \* significativo em relação ao CN,  $p < 0,005$ .

### 3.5 Alteração Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC)

O IPBC, obtido pelos ensaios que avaliaram o índice de proliferação celular, induzido pelo nutracêutico Cacti-Nea™ sobre as células HepG2, mostraram que as concentrações avaliadas neste estudo (0,002, 0,004 e 0,006 g/mL) apresentaram um efeito antiproliferativo semelhante ao observado para o teste CP (Figura 2).

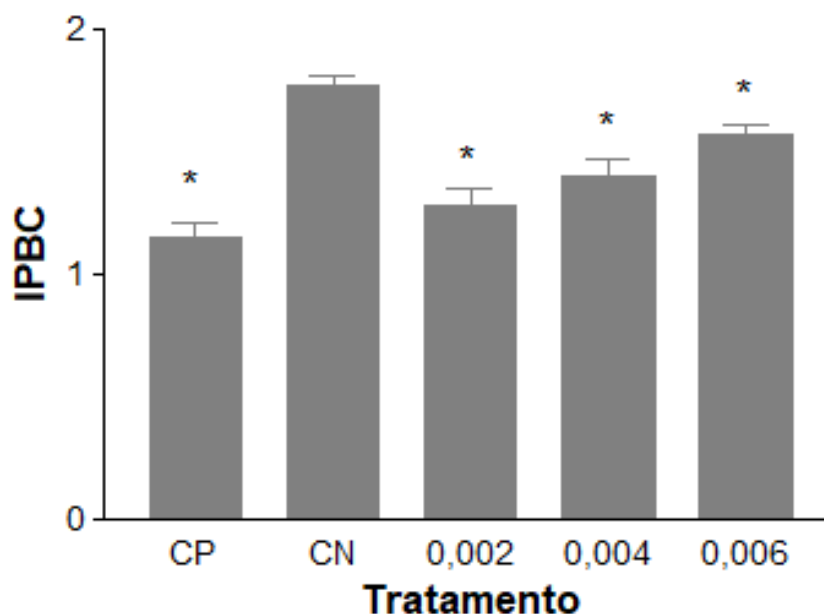


Figura 2: Índice de Proliferação com Bloqueio de Citocinese (IPBC) para estimar o potencial proliferativo do nutraceutico Cacti-Nea™ sobre células HepG2.

CP: Controle Positivo; CN: Controle Negativo, tratamento em g/mL, \* significativo em relação ao CN,  $p < 0,05$ .

### 3.6 Avaliação de indução de estresse oxidativo pelo nutraceutico Cacti-Nea™

Os efeitos dos extratos de Cacti-Nea™, sobre o mecanismo de defesa antioxidante das células HepG2, foram avaliados pelas atividades das enzimas SOD e GST e pelos níveis de GSH e TBARS. Somente os resultados da dosagem dos níveis de GST, de todos os tratamentos testados (0,002; 0,004 e 0,006 g/mL), exibiram diferença significativa, em relação ao CN (Figura 3).

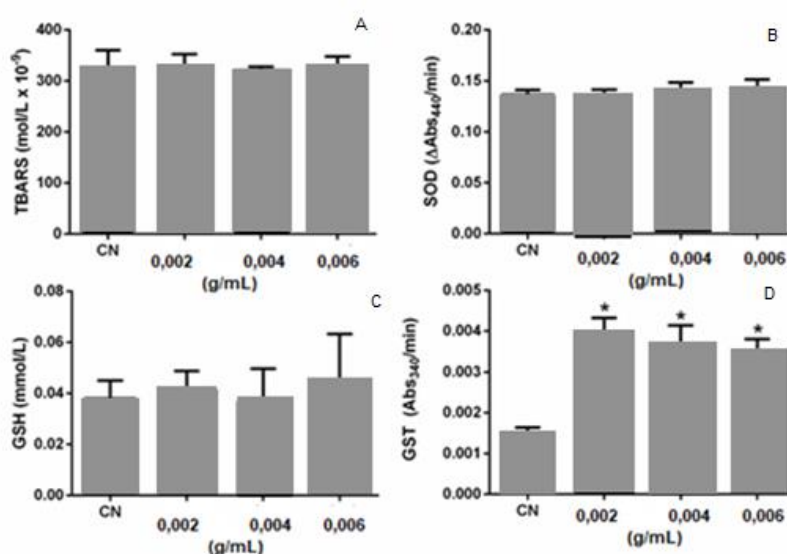


Figura 3: Efeitos nos níveis de TBARS (espécies reativas ao ácido Tiobarbitúrico) (A); SOD (Superóxido Dismutase) (B); GSH (Glutathiona Reduzida) (C); GST (Glutathiona S-transferase) (D), sobre células HepG2 exposta a diferentes concentrações do nutraceutico Cacti-Nea™. CN: Controle Negativo, tratamento em g/mL, \* significativo em relação ao CN,  $p < 0,05$  (ANOVA – pos hoc Dunnet).

#### 4. DISCUSSÃO

Para que um composto seja classificado como alimento funcional é necessário que sejam identificadas as suas propriedades benéficas à saúde, além das suas propriedades nutricionais básicas para a alimentação. O termo nutraceutico define uma ampla variedade de alimentos e componentes alimentícios com apelos médico ou de saúde. Sua ação varia do suprimento de minerais e vitaminas essenciais até a proteção contra várias doenças (SOUZA et al., 2003).

Os polifenóis são metabólitos extensivamente estudados por suas inúmeras propriedades farmacológicas, como efeitos anti-inflamatórios e citotóxicos para células cancerígenas (CURTI et al., 2017). As propriedades antioxidantes de betalainas, presentes nos frutos de *O. ficus indica*, foram estudadas em humanos por Tesoriere et al.(2005). Os

autores observaram que, após a ingestão oral de seus frutos, houve um aumento nos níveis de LDLs e diminuição do estresse oxidativo celular.

Os frutos da espécie *O. ficus indica* são ricos em betalaínas, como a betanina e indicaxantina. Dentre as betalainas presentes nestes frutos, as mais prevalentes são as indicaxantinas, pertencentes à família das betaxantinas. As betaninas, do grupo das betacianinas, também estão presentes nos frutos desta espécie vegetal, porém em concentrações inferiores (STINTZING, SCHIEBER, CARLE, 2005).

Bisson et al.(2010) avaliaram a concentração de betanina (betacianina) e indicaxantina (betaxantina), pela técnica de HPLC, e encontraram valores de 0,011% e 0,045% respectivamente para esses pigmentos. Esses dados corroboram os resultados do presente estudo, onde foram observados valores semelhantes para esses mesmos pigmentos (0,015% e 0,059 %, para betacianinas e betaxantinas respectivamente).

Estudos de viabilidade e toxicidade celular, realizados por Yoo et al.(2014), pela técnica do MTT, com extrato aquoso de *Beta vulgares* L. (beterraba), uma planta rica em betalaínas, mostraram uma resposta concentração-dependente entre esses pigmentos e a toxicidade observada. Os resultados obtidos neste estudo, pelo teste do MTT, com o nutracêutico Cacti-Nea™, um composto também ricos em betalaína, mostraram que as maiores concentrações testadas (0,03; 0,01; 0,008 g/mL) foram tóxicas para as células HepG2, do que as concentrações mais baixas (0,006; 0,004 e 0,002 g/mL), confirmando a mesma correlação de citotoxicidade concentração-dependente, o que comprova as inferências de Yoo et al.(2014) sobre a ação citotóxicas das betalaínas. Um estudo realizado com extratos aquosos de *O. ficus indica* por Chavez-Santoscoy et al.(2009), também evidenciaram uma diminuição na viabilidade celular em linhagens de células cancerígenas de colón e próstata humanas.

Os efeitos da Cacti-Nea™ sobre a viabilidade das células HepG2, também foram avaliados pelo ensaio do Azul de Trypan. Todas as concentrações avaliadas por este teste (0,002; 0,006 e 0,008 g/mL) apresentaram resultados de viabilidade celular superiores a 85 % confirmando os resultados obtidos no teste do MTT (80 %) realizado com esse mesmo produto comercial.

Os agentes genotóxicos apresentam, em comum, propriedades químicas e físicas que permitem a sua interação com os ácidos nucleicos (De FLORA et al., 1996). Muitas

dessas alterações podem se caracterizar como mutações genéticas, e serem responsáveis por diferentes etapas de processos carcinogênicos. Alguns testes biológicos, como o ensaio do cometa, são capazes de detectar a ação de agentes genotóxicos ou de substâncias com potenciais de riscos à saúde humana (GÜEZ et al., 2012). Pelo ensaio do cometa (parâmetro intensidade da cauda), foi possível observar que as concentrações testadas de Cacti-Nea™ não promoveram quebras no DNA das células HepG2, não sendo, portanto, genotóxica para essas células.

El-Mostafa et al.(2014) avaliaram, por meio do ensaio de MN realizado com rato Wistar, o potencial genotóxicos do extrato do fruto da *O. ficus-indica*. Esse estudo indicou que o fruto desta planta não apresenta efeito mutagênico para esses organismos testados. Estudos *in vitro* desenvolvidos por Curti et al.(2017) demonstraram que extratos de diversas plantas ricas em polifenóis, bem como polifenóis isolados, administrados individualmente ou em combinação, podem regular os mecanismos apoptóticos celulares, principalmente por mecanismos intrínsecos e extrínsecos. Pela ação observada para esses compostos, os autores sugerem que os polifenóis devam ser mais investigados, quanto aos seu potencial antiproliferativo e, conseqüentemente, anticarcinogênico. No presente estudo, foi evidenciado, pelo ensaio do IPBC, que a Cacti-Nea™ apresentou um potencial antiproliferativo inversamente dependente, à concentração usada. Esses dados podem estar associados com a alta presença de polifenóis no nutracêutico, conforme citado por Curti et al.(2017). No entanto, nossos dados são discordantes com os descritos por Yoo et al. (2014), no qual os autores evidenciaram uma diminuição da proliferação da celular com o aumento da concentração da betalaína, um dos componentes bioativos do nutracêutico aqui estudado

A atividade dos diferentes sistemas antioxidantes biológicos são de extrema importância para a sobrevivência celular. Os organismos eucariotos possuem enzimas antioxidantes, como a Superóxido Dismutase (SOD) e a Glutathione Peroxidase (GPx), que interagem com os compostos oxidantes inibindo a formação de radicais livres nas células (CHAVEZ-SANTOSCOY, GUTIERREZ-URIBE, SERNA-SALDÍVAR; 2009). Soma-se a este sistema, enzimas coadjuvantes e importantes na ação antioxidante, como a Glutathione Redutase (GR) e a Glutathione S-Transferase (GST). A enzima GR é responsável pela redução da Glutathione Oxidada (GSSG) em Glutathione Reduzida (GSH), recuperando,

neste processo, a GSH, e promovendo a manutenção da razão GSH/GSSG nas células (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

Dentre os agentes enzimáticos e não enzimáticos associados aos sistemas antioxidantes celulares, estudados no presente estudo, apenas a enzima GST apresentou resultados estatisticamente diferentes do CN. Os níveis aumentados de GST, observados para células HepG2 submetidas a ação de diferentes concentrações do nutracêutico Cacti-Nea<sup>TM</sup>, mostrou uma relação inversamente proporcional à concentração testada, resultados esses que se assemelham aos do IPBC, descritos anteriormente (quanto menor concentração, maior o efeito antiproliferativo). Os resultados obtidos para essa enzima mostram que, embora elas não atuem diretamente na inativação das ERs, elas estão associadas à detoxificação do nutracêutico, por favorecer a sua biotransformação e, conseqüentemente, a sua excreção. Essas inferências se baseiam nas citações de Halliwell e Gutteridge (2006), em que os autores afirmam que este sistema enzimático (GST) é uma importante defesa celular, pois está associado à detoxificação e excreção de hidroperóxidos, bem como à biotransformação de xenobiontes e fármacos.

Os dados encontrados no presente estudo demonstram que, apesar das concentrações de GST estarem aumentadas (indicando possivelmente a via de metabólica do nutracêutico), não há alterações significativas nos níveis de GSH, enzima indicadora de função e viabilidade celular (PARTORI et al., 2003) e nas concentrações de TBARS compostos estes envolvidos com o processo de peroxidação lipídica (HALLIWELL; GUTTERIDGE, 2006).

Outros nutracêuticos obtidos de frutos ricos em betalainas também não apresentaram alterações que possam indicar estresse oxidativo como por exemplo *Rivina humilis berries* (KHAN et al., 2012), *Tamarindus indica pulpa* (RAZALI; AZIZ; JUNIT, 2010) e *Beta vulgaris* (Yoo et al., 2014), dados estes que corroboram com os resultados do presente estudo.

Hwang, Kang e Lim (2017) avaliaram o potencial antioxidante de compostos bioativo isolados das sementes de *O. ficus-indica* (*Cactaceae*), frente aos danos causados pelo etanol, em fígado de ratos. Os autores apontam que os compostos presentes neste material botânico apresentam um potencial protetivo contra o EO, efeito esse também confirmado por Zourgui et al., (2008); Croute et al., (2008); Harrabi et al., (2017).

## 5. CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo indicam que as concentrações de 0,002; 0,004 e 0,006 g/mL do nutracêutico Cacti-Nea™ não induziram efeitos genotóxicos e mutagênicos para as células humanas HepG2.

É possível afirmar que a Cacti-Nea™ apresenta um efeito tóxico concentração dependente, fato esse associado com o seu teor de betalainas presente nos frutos de *O. ficus indica*. Essa classe de pigmento promove, em altas concentrações, a diminuição da viabilidade celular e, em baixas concentrações, um maior efeito antiproliferativo. É possível inferir que esses resultados possam estar associados a um potencial efeito antiproliferativo para este nutracêutico. Contudo, para a comprovação desta ação, há necessidade de realização de mais estudos com esse nutracêutico, que devem ser realizados tanto em testes *in vivo* como *in vitro*.

A Cacti-Nea™ não alterou as atividades da enzima SOD e dos níveis séricos de GSH e TBARS das células HepG2, mas aumentou, significativamente, os níveis da enzima GST, para todas as concentrações testadas neste estudo (0,002; 0,004 e 0,006 g/mL), mostrando que o nutracêutico deve ser melhor investigado, quanto aos seus efeitos sobre mecanismo de defesa antioxidante das células.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA, E. Agroecología, cultivo y uso del nopal. **Estudo FAO Producción y protección vegetal**. p. 132, 225, 1999.

BENZIANE, A., BOUTEKRABT, A., TOUATI, M., BAKRIA, T., TOUATI, A., BEZINI, E. Phenotypic diversity of *Opuntia ficus indica* (L.) MILL. in the Algerian steppe. **South African Journal of Botany**. 109. 66-74. 2017. DOI 10.1016/j.sajb.2016.12.024.

BISSON, JF; DAUBIÉ, S; HIDALGO, S.; GUILLEMET, D; LINARÉS, E. Diuretic and antioxidant effects of Cacti-Nea®, a dehydrated water extract from prickly pear fruit, in rats. **Phytother. Res.** 24: 587–594, 2010.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 16**, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 231**, de 03 de dezembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999b.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. *Methods and Enzymology*, v. 52, p. 302-310, 1978.

CAI, Y; SUN, M.; SCHLIEMANN, W; CORKE, H. Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigments from *Celosia argentea*. **Journal of agricultural and food chemistry**. 2001. 49: 4429-35. 10.1021/jf0104735.

CHAVEZ-SANTOSCOY R., GUTIERREZ-URIBE J., SERNA-SALDÍVAR S. Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. **Plant Foods Hum. Nutr.** (Formerly *Qualitas Plantarum*), 64 (2), 2009, pp. 146-152.

CHIACCHIO, F.P.B. et al. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.39-49, 2006.

COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008.

CURTI, V; DI LORENZO, A; DACREMA, M; XIAO, J; NABANI, SM; DAGLIA, M. *In vitro* polyphenol effects on apoptosis: an update of literature data. **J Sem Cancer** [on line]. 2017. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.semancer.2017.08.005>.

DE FLORA S.; IZZOTTI, A.; RANDEPATH, K.; RANDEPATH, E.; BARTSCH, H.; NAIR, J.; BALANSKY, R.; VAN SCHOOTEN, F.; DEGAN, P.; FRONZA, G.; WALSH, D.; LEWTAS, J. DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. *Mutat. Res.*, v.366, n.3, p.197-238, 1996.

- ELLMAN, G. L. Tissue sulfhydryl groups. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.
- EL-MOSTAFA, K.; EL-KHARRASSI, Y.; BADREDDINE, A.; ANDREOLETTI, P.; VAMECQ, J.; EL-KEBBAJ, M.S.; LATRUFFE, G.; NASSER, B.; CHERKAOUI-MALKI, M. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease, **Molecules**, Basel, v. 19, n. 9, p. 14879-14901, 2014.  
doi:10.3390/molecules190914879.
- ENNOURI, M., FETOUI, H., BOURRET, E., ZEGHAL, N., ATTIA, H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. **Bioresource Technology**, 97 (12), 2006, p. 1382-1386.
- ERNEST, E. **Heavy metals in traditional Indian remedies**. *Eur. J. Clin. Pharmacol*, v. 57, p. 891-896, 2002.
- FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81–95, 2000.
- GÜEZ, C. M.; WACZUK, E. P.; PEREIRA, K. B.; QUEROL, M. V. M.; ROCHA, J. B. T.; OLIVEIRA, L. F. S. In vivo and in vitro genotoxicity studies of aqueous extract of *Xanthium spinosum*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 48 (3): , 2012
- HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.
- HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5 ed. 2006.
- HARRABI B, ATHMOUNI K, HAMDAOUI L, BEN MAHMOUD L, HAKIM A, EL FEKI A, ZEGHAL K, GHOZZI H. Polysaccharides extraction from *Opuntia stricta* and their protective effect against HepG2 cell death and hypolipidaemic effects on hyperlipidaemia rats induced by high-fat diet. **Arch Physiol Biochem**. 2017 Oct;123(4):225-237. doi: 10.1080/13813455.2017.1307413.

HWANG SH, KANG I-J, LIM SS. Antidiabetic Effect of Fresh Nopal (*Opuntia ficus-indica*) in Low-Dose Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Fed a High-Fat Diet. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**. 2017;2017:4380721. doi:10.1155/2017/4380721.

KHAN K, et al. Single-molecule DNA analysis reveals that yeast Hop1 protein promotes DNA folding and synapsis: implications for condensation of meiotic chromosomes. **ACS Nano**, 2012, 6(12):10658-66

LEO, M, BRUZUAL DE ABREU, M. PAWLOWSKA, AM., CIONI, L., BRACA, M. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus indica* flowers by HPLC-P-DA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. **Phytochemistry Letters** 3 (1), p48-52. 2010.

LEUENBERGER, B. Interpretation and tipification of cactus *ficus-indica* L. and *Opuntia ficus indica* (L.) Miller (Cactaceae). **Taxon.**, 1991.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MARQUES, R, MARREIRO, D.N. Metabolic and functional aspects of zinc in Down syndrome. **Rev. Nutr., Campinas**, 19(4):501-510, jul./ago., 2006.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**. 65, 55-63, 1983.

NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, v.504, n.6, p. 3-16, 2002.

OECD, ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 487: **In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**. Disponível em: < [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitromammalian-cellmicronucleus-test\\_9789264224438-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitromammalian-cellmicronucleus-test_9789264224438-en)>. Acesso em 28/11/2017.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANFITH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Exptl. Cell Res.**, v. 198, p. 259-260, 1992.

PATEL, C., GARREC, J., DUPONT, C., AND DUMONT, E. What singles out the G[8-5]C intrastrand DNA cross-link? Mechanistic structural insights from quantum mechanics/molecular mechanics simulations. **Biochemistry** 52, 425–431. 2013. doi: 10.1021/bi301198h.

SILVA, A.L.L.; ARAUJO, M.G.S.; BASTOS, M.L.A.; BERNARDO, T.H.L.; OLIVEIRA, J.F.S.; SILVA-JUNIOR, E.F.; SANTOS-JUNIOR, P.F.S.; ARAUJO, M.V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; VERISSIMO, R.C.S.S. Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e antioxidante da espécie vegetal *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.307-315, 2016. DOI 10.1590/1983-084X/15\_145.

SINGH N. P., MCCOY M. T., TICE R. R., SCHNEIDER E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** 1988 175 184–191 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

STINTZING FC, CARLE R. Cactus stems (*Opuntia spp.*): a review on their chemistry, technology, and uses. **Mol Nutr Food Res.** 2005 Feb;49 (2):175-94.

TAKAHASHI, T. et al., Isolation and characterization of sake yeast mutants deficient in gamma-aminobutyric acid utilization in sake brewing. **J. Biosci. Bioeng** 97 (6): 412-8. 2004.

TESORIERE L, FAZZARI M, ALLEGRA M, et al. Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of sicilian cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. **J Agric Food Chem.** 2005; 53(20):7851-5.

TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU JC, SASAKI YF. Single cell gel/ Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo. **Environ. Mol. Mutagen.** 2000; v.35: p. 206- 221.

WOLFRAM, RM, KRITZ, H, ETHIMIOU, Y, STOMATOPOULOS, J, SINZINGER, H. Effect of pear (*Opuntia robusta*) on glucose and lipidic metabolism in nondiabetics with hyperlipidemia: a pilot study. **Wien Klin Wochenschr**, 114, 840-846.

WORLD HUMAN ORGANIZATION. **Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.** Geneva; 2007.

YOO, H. et al. Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. **Inflammation Research**, v. 63, p. 197-206, 2014.

## 8 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A constante busca da população por alimentos funcionais demandam intensas pesquisas de desenvolvimento de nutracêuticos.

A amostra de CactiNea™ avaliada neste estudo apresentou-se dentro dos parâmetros pré-estabelecidos de qualidade, preconizados pela Farmacopeia Brasileira (2010). Os ensaios de atividade antimicrobiana demonstraram o potencial antimicrobiótico deste nutracêutico e os testes de atividades antioxidantes (DPPH e viabilidade celular realizados com a levedura *Saccharomyces cerevisiae*) confirmaram essa ação do composto estudado

O *screening* fitoquímico comprovou a presença de flavonoides, taninos e saponinas e permitiu a quantificar os níveis de polifenóis e betalaínas. A presença destes pigmentos vem sendo correlacionada com atividades terapêuticas, o que permitiu, que o presente estudo correlacionasse a presença de betalaínas com o efeito antiproliferativo da Cacti-Nea™, o qual deve ser mais estudado com o intuito de verificar as vias celulares envolvidas e se há ou não especificidade celular para este efeito.

Os ensaios com o organismo teste *A. cepa* indicaram a diminuição do índice mitótico, e potencial genotóxico para todas as concentrações avaliadas, ao avaliar o dano fixado nas células F1, somente a concentração 0,002 g/mL, demonstrou potencial mutagênico. Infere-se que este sistema teste é um ótimo bioindicador para ser usado como um primeiro *screening* de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de nutracêuticos devido ao seu baixo custo, confiabilidade e concordância com outros testes. Este teste também pode ser correlacionado com estudos de prevenção de danos na saúde humana e servir de alerta quanto a riscos potenciais decorrentes de consumo irracional de produtos naturais e inferir sobre a segurança de utilização desses produtos.

Os ensaios conduzidos com a linhagem celular HepG2 mostraram que a Cacti-Nea™ não apresenta efeitos genotóxicos, mutagênicos, além de não alterar o sistema antioxidante celular. A diferença entre os resultados dos ensaios genotóxicos e mutagênicos entre os organismos testes avaliados (*A. cepa* e HepG2), podem sugerir que as enzimas metabolizadoras constantes na HepG2 diminuem o potencial genotóxico e mutagênico do composto.

Os estudos realizados com a Cacti-Nea™ evidenciaram potenciais terapêuticos para este nutracêutico, indicando que ele pode ser utilizado tanto na reversão de processo de alta proliferação celular (como tumores benígnos e malignos), quanto como agente antimicrobiano e antioxidante. Contudo, para a comprovação destas ações, há necessidade de realização de mais estudos com esse nutracêutico, tanto em testes *in vivo* como *in vitro*, pois há evidências também que esse produto altera os níveis de uma importante enzima envolvida na metabolização de xenobiontes (GST).

## 9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBANO C, NEGRO C, TOMMASI N, *et al.* Betalains, phenols and antioxidant capacity in cactus pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.] fruits from *Apulia* (South Italy) genotypes. **Antioxidants** (Basel).;4(2):269-80, 2015.
- ALÍA, M; MATEOS, R; RAMOS, S; LECUMBERRI, E; BRAVO, L; GOYA, L. Influence of Quercetin and Rutin on Growth and Antioxidant Defense System of a Human Hepatoma Cell Line (Hepg2). **Eur J Nutr** 2006. 45:19-28, 2006.
- ALLAMEH, A.; VANSOUN, E. Y.; ZARGHI, A. Role of glutathione conjugation in protection of weanling rat liver against acetaminophen-induced hepatotoxicity. **Mechanisms of ageing and development**, v. 95, n. 1-2, p. 71–79, 1997.
- ALMEIDA, P. M.; Potencial **Genotóxico do Extrato Foliar e do Látex de Pinhão Roxo (*Jatropha gossypifolia* L.)**. Universidade Federal de Pernambuco. 2014.
- ALVARENGA, EC; CAIRES, A; LADEIRA, LO; GAMERO, EJP; ANDRADE, LM; PAZ, MTL; LEITE, MF. Potenciais alvos terapêuticos contra o câncer. **Ciência e Cultura**, 66(1), 43-48. 2014.
- ALVES, M. S. M.; MENDES, P. C.; VIEIRA, J. G. de POZELA, E. F.; BARBOSA, W. L. R.; SILVA JÚNIOR, J. O. C. Análise farmacognóstica das folhas de *Arrabidaea chica* (Humb. & Bonpl.) B. Verlt., *Bignoniaceae*. *Brazilian Journal of Pharmacognosy*, v. 20, n. 2, p. 215 - 221, 2010.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION**. Position of the American Dietetic Association: dietary guidance for healthy children ages 2 to 11 years. *J Am Diet Assoc*. 2004; 104(4):660-77.
- AMES, BN. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v.221,.2,p. 1256-1264, 1983.
- ANDLAUER, W.; FÜRST, P. Nutraceuticals: a piece of history, present status and outlook. **Food Research International**. v. 35, p. 171-176, 2002.

ANJO, D F C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J Vasc Br** 2004; Vol. 3, Nº2: 145-154.

ANUNCIATO, T. P. **Nutricosméticos**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto. Dissertação de Mestrado, 2011.

ARAI, S. Studies on functional foods in Japan – State of the art. **Biosci. Biotechnol. Biochem**, v.60, n.1, p.9-15, 1996.

ARAYA, H.; LUTZ, M.R. Alimentos funcionales y saludables. **Rev. Chil. Nutr.**, v.30, n.1, p.8-14, 2003.

ARRAES, A. I. O. M.; LONGHIN, S. R. Otimização de ensaio de toxicidade utilizando o bioindicador *Allium cepa* como organismo teste. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer – Goiânia. v.8, n.14, p. 1958-1972, 2012.

AUGUSTO, O. **Radicais Livres: Bons, maus e naturais**, Oficina de Textos: São Paulo, 2006.

BAGATINI MD, SILVA ACF, TEDESCO SB. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Rev Bras Farmacogn* 17: 444-447. 2007.

BANDEIRA, M.F.C. & et al. **Jornal Brasileiro de Clínica Estética e Odontologia**, 3(17): 47, 1998.

BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA, E. **Agroecología, cultivo y uso del nopal**. Estudio FAO Producción y protección vegetal. p. 132, 225, 1999.

BARRY, V.C.; O'ROURKE, L. & TWOMEY, D. Antitubercular activity of diphenil ether and related compounds. **Nature** 160: 800. 1947.

BASSANI, V. L.; GONZÁLES, O. G.; PETROVICK, P. R.. Desenvolvimento Tecnológico de Produtos Fitoterápicos. **Revista Fitos Eletrônica**, [S.l.], v. 1, n. 01, p. 14-17, out. 2013.

BAUER, A.W.; KIRBY, W.M.M.; SHERRIS, J.C. & TRUCK, M. Antibiotic Susceptibility Testing by a Standardized Single Disk Method. **The American Journal of Clinical Pathology** 45(4): 493-496. 1966.

BENZIANE, A., BOUTEKRABT, A., TOUATI, M., BAKRIA, T., TOUATI, A, BEZINI, E. Phenotypic diversity of *Opuntia ficus indica* (L.) MILL. in the Algerian steppe. **South African Journal of Botany**. 109. 66-74. 2017. DOI 10.1016/j.sajb.2016.12.024.

BERRA, CM, MENCK, CFM. Estresse oxidativo, lesões no genoma e processos de sinalização no controle do ciclo celular. **Quim. Nova** 29 (6), 2006, 1340-1344.

BISSON, JF; DAUBIÉ, S; HIDALGO, S.; GUILLEMET, D; LINARÉS, E. Diuretic and antioxidant effects of Cacti-Nea®, a dehydrated water extract from prickly pear fruit, in rats. **Phytother. Res.** 24: 587–594, 2010.

BONASSI, S; EL-ZEIN, R; BOLOGNESI, C; FENECH, M. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes and cancer risk: evidence from human studies. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 93-100, 2011.

BONFILIO, R.; et al. Farmácia magistral: sua importância e seu perfil de qualidade. **Rev. Bai. Sau. Púb.**, v.34, n.3, p. 653-654, 2010.

BRASIL. **Portaria nº 15**, de 30 de abril de 1999. Institui junto à Câmara Técnica de Alimentos a Comissão de Assessoramento Tecnocientífico em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, com a incumbência de prestar consultoria e assessoramento em matéria relacionada a alimentos funcionais e novos alimentos, segurança de consumo e alegação de função em rótulos, submetidos por lei ao regime de vigilância sanitária. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, 03 maio.1999. Disponível em: Acesso em: 24 mar. 2018. 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 16**, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 231**, de 03 de dezembro de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as

Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução-RDC ANVISA nº 2**, DE 7 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde, e dá outras providências. Brasília, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária, **Resolução nº 14**, de 31 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília; 2010.

BÜCKER A, CARVALHO W AND ALVES-GOMES JÁ. Avaliação of mutagenicity and genotoxicity in *Eigenmannia virescens* (Teleostei, Gymnotiformes) exposed to benzene. **Acta Amaz.** 2006, 36:357-364.

BUEGE, J.A.; AUST, S.D. Microsomal lipid peroxidation. **Methods and Enzymology**, v. 52, p. 302-310, 1978.

BUENO, A. C.; PIOVEZAN, M.; Bioensaio toxicológico utilizando *Artemia salina*: fatores envolvidos em sua eficácia. Instituto Federal de Santa Catarina. 2015. Disponível em: <<http://docente.ifsc.edu.br/michael.nunes/MaterialDidatico/Analises%20Quimicas/TCC%20II/TCC%202015%202/Ariele.pdf> > Acesso em: 15 dez. 2016.

BUNCHORNTAVAKUL, C, REDDY, R, Acetaminophen-related hepatotoxicity. **Clinical Liver Diseases**, 17 (4), 2013, 587-607.

BUTERA, D.; TESORIERE, L.; DI GAUDIO, F.; BONGIORNO, A.; ALLEGRA, M.; PINTAUDI, A.M.; KOHEN, R.; LIVREA, M.A. Antioxidant Activities of Sicilian Prickly Pear (*Opuntia ficus indica*) Fruit Extracts and Reducing Properties of Its Betalains: Betanin and Indicaxanthin. **J. Agric. Food Chem.** 2002, 50, 6895–6901.

CAI, Y; SUN, M.; SCHLIEMANN, W; CORKE, H. Chemical Stability and Colorant Properties of Betaxanthin Pigments from *Celosia argentea*. **Journal of agricultural and food chemistry**. 2001. 49: 4429-35. 10.1021/jf0104735.

- CAZARIN, K C C; CORRÊA, C L; ZAMBRONEL, F A D. **Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual**, 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v40n3/04.pdf>. Acesso em: 1 de julho de 2016.
- CHAUHAN LKS, SAXENA PN, GUPTA SK. Cytogenetic effects of cypermethrin and fenvalerate on the root meristem cells of *Allium cepa*. **Environ Exp Bot** 42: 181-189. 1999.
- CHAVEZ-SANTOSCOY R., GUTIERREZ-URIBE J., SERNA-SALDÍVAR S. Phenolic composition, antioxidant capacity and in vitro cancer cell cytotoxicity of nine prickly pear (*Opuntia* spp.) juices. **Plant Foods Hum. Nutr.** (Formerly Qualitas Plantarum), 64 (2), 2009, pp. 146-152
- CHIACCHIO, F.P.B. et al. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semi-árido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, n.3, p.39-49, 2006.
- COLLA, L.M., MORAES, F.P. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Rev eletron farm.** vol 3 (2), 99-112, 2006.
- COLLINS, A. R.; OSCOZ, A. A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO, I.; GIOVANELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C. C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, v. 23, p. 143–151, 2008
- CORREIA, D. S.; SIQUEIRA, E. A.; ARAÚJO, S. S.; SILVA, C. M. A.; SILVA, M. V.; BRASILEIRO-VIDAL, A. C.; **Avaliação do potencial tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato foliar de *Anadenanthera colubrina* (Vell.) Brenan por meio o sistema teste *Allium cepa* L.** UFPE, Recife, PE. 2014. Disponível em: <file:///C:/Documents%20and%20Settings/Geral/Meus%20documentos/Downloads/25 49-7333-1-PB.pdf > Acesso em: 20 mar. 2016
- COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. Compostos bioativos e efeitos fisiológicos/orgânicos. Editora Rubio Ltda, Rio de Janeiro, 2ª. edição, 2016. 480p.

COUTO RO, VALGAS AB, BARA, MTF, PAULA JR. Caracterização físico-química do pó das folhas de *Eugenia dysenterica* DC. (Myrtaceae). **Rev Eletronica Farm.** 2009;6(3):59-69

CRUZAT, VF, ROGERO, MM, BORGES, MC, TIRAPEGUI, J. Aspectos atuais sobre estresse oxidativo, exercícios físicos e suplementação. **Rev Bras Med Esporte** 13, 2007, set/out.

CUNHA, AP; SILVA, AP; ROQUE, OR. **Plantas e Produtos Vegetais em Fitoterapia.** Lisboa: Calouste Gulbenkian. 2003.

CURTI, V; DI LORENZO, A; DACREMA, M; XIAO, J; NABANI, SM; DAGLIA, M. In vitro polyphenol effects on apoptosis: an update of literature data. **J Sem Cancer** [on line]. 2017. DOI:<http://dx.doi.org/10.1016/j.semancer.2017.08.005>.

DALVI SM, PATIL VW, RAMRAJE NN, PHADTARE JM, GUJARATHI SU. Nitric oxide, carbonyl protein, lipid peroxidation and correlation between antioxidant vitamins in different categories of pulmonary and extra pulmonary tuberculosis. **Malays. J. Med. Sci.**, 20 (2013) 21–30.

DAVID, JM, DAVID, JP, BARREIRO ALBS. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Quim. Nova** 9 (1), 2006. 113-123.

DELARMELINA, JM, BATITUCCI, CMCP, GONÇALVES, JLO. Efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da tintura de *Matricaria chamomilla* L. in vivo. **Rev Cub de plan med**, 17 (2): 149-159. 2012.

DENG, J; CHENG, W; YANG, G. A novel antioxidant activity index (AAU) for natural products using the DPPH assay., **Food Chemistry** v. 125, n. 4, p. 1430-1435, 2011. ISSN 0308-8146.

DE ALMEIDA, J X, DE MELO E MEDEIROS, F P, MARQUES DE MELO, A J, CAVALCANTI DA SILVA, J, PIRES DANTAS, J, Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) in vivo. **Rev de Biol e Ciên da Terra** [en linea] 2005, 5.

- DE-SOUZA MM, GARBELOTO M, DENEZ K, EGER-MANGRICH I. Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. **Rev. Bras. Farmacogn** 16: 365-371. 2006.
- DHAWAN A, BAJPAYEE M, PARMAR D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell Biol Toxicol**. 2009;25:5–32.
- DIPASQUALE, L. C.; HAYES, A. W. **Acute toxicity and eye irritancy**. In: HAYES, A. W. Principles and methods of toxicology. 4.ed. London: Taylor & Francis, 2001. cap. 18, p. 853-916.
- DUSINSKA M., COLLINS A. R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**. 2008 23 191–205 10.1093/mutage/gen007
- EL KOSSORI RL, VILLAUME C, EL BOUSTANI E, ET AL. Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). **Plant Foods Hum Nutr**. 1998; 52(3):263-70.
- ELGORASHI EE, TAYLOR JLS, MAES A, VAN STADEN J, DE KIMPE N, VERSCHAEVE L. Screening of medicinal plants used in South African traditional medicine for genotoxic effects. **Toxicol Lett** 2003;143:195-207.
- ELLMAN, G. L. **Tissue sulfhydryl groups**. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 82, n. 1, p. 70–77, 1959.
- EL-MOSTAFA, K.; EL-KHARRASSI, Y.; BADREDDINE, A.; ANDREOLETTI, P.; VAMECQ, J.; EL-KEBBAJ, M.S.; LATRUFFE, G.; NASSER, B.; CHERKAOUI-MALKI, M. Nopal Cactus (*Opuntia ficus-indica*) as a Source of Bioactive Compounds for Nutrition, Health and Disease, **Molecules**, Basel, v. 19, n. 9, p. 14879-14901, 2014. doi:10.3390/molecules190914879.
- EL-RAZEK, ABD; EL-METWALLY, FH; SHEHAB, M; HASSAN, GMG; AHMAD, AA; ZEENAT, W; AHMAD, F; ANSARI, M. Medicinal plants as potent diuretic: A review. **Int J Adv Pharm Med Bioallied Sci**. 2017; 2017:122.

ENNOURI, M., FETOUI, H., BOURRET, E., ZEGHAL, N., ATTIA, H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. **Bioresource Technology**, 97 (12), 2006, p. 1382-1386.

ERNEST, E. **Heavy metals in traditional Indian remedies**. Eur. J. Clin. Pharmacol, v. 57, p. 891-896, 2002.

FAIRBAIRN, D., W.; OLIVE, P., L.; O'NEILL, K., L. The comet assay: A comprehensive review. **Mutation Research**, 1995. 339(1): 37-59.

FALKENBERG; M.B.; SANTOS, R.I.; SIMÕES, C.M.O. Introdução à análise fitoquímica. In: SIMÕES et al (org). **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 6ed., Editora da UFSC, UFRGS Editora, 1104 p. 2007.

FALLER, A; FIALHO, E. Polyphenol content and antioxidant capacity in organic and conventional plant foods. **Journal of Food Composition and Analysis**. 2010. 23:561–568.

**FARMACOPEIA BRASILEIRA**. 4ª ed. Parte 1-2. São Paulo: Atheneu Editora; 1988-2000.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81–95, 2000.

FENECH, M., KIRSCH-VOLDERS, M., NATARAJAN, A. T., SURRALLES, J., CROTT, J. W., PARRY, J. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**. 2011, 26, 125–132. doi: 10.1093/mutage/geq052

FENECH, M; CROTT, J; TURNER, J; BROWN, S. Apoptosis, cytostasis and DNA damage in human lymphocytes measured simultaneously within the cytokinesis-block micronucleus assay: description of the method and results for hydrogen peroxide. **Mutagenesis**, v. 14, p. 605-612, 1999.

FERNANDES, T. C. C., MAZZEO, D. E. C., MARIN-MORALES, M. A. Mechanism of micronuclei formation in polyploidized cells of *Allium cepa* exposed to trifluralin herbicide. **Pesticide Biochemistry and Physiology**, 88: 252–259, 2008.

FERNANDES, T. C. C.; MAZZEO, D. E. C.; MARIN-MORALES, M. A. Origin of nuclear and chromosomal alterations derived from the action of an aneugenic agent—Trifluralin herbicide. **Ecotoxicology and Environmental Safety**, v. 72:1680–1686, 2009.

FERREIRA, A. G.; ÁQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia. **Rev. Bras. Fisiol. Veg.**, v. 12, p. 175-204, 2000. (Edição Especial).

FERREIRA, ALA, MATSUBARA, LS. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Rev. Assoc. Med. Bras** 43 (1), 1997, 61-8.

FERREIRA, V F. PINTO, A C. A fitoterapia no mundo atual. **Quím. Nova**. 2010, vol.33, n.9, pp. 1829-1829.

FIRMO, W. da C. A. MENEZES, V DE.J.M.; PASSOS, C.E de .C.; DIAS,C.N.; ALVES,L.P.L.; DIAS, I.C.L.; NETO, M.S.; OLEA, R.S.G.; Contexto Histórico, Uso Popular e Concepção Científica sobre Plantas Medicinais. **Cadernos de Pesquisas (UFMA)**. São Luís, v. 18, n. especial, dez. 2011.

FISKESJÖ, G. The *Allium* test as a standard in environmental monitoring. **Hereditas**, vol. 102, no. 1, p. 99-112. PMID:3988545. 1985.

FLORES, M; YAMAGUCHI, M.U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

**FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS**. Cactus (*Opuntia spp.*) as forage. Rome: FAO. 2001. (Plant Production and Protection Paper/FAO; 169).

FRAME - FUND FOR THE REPLACEMENT OF ANIMALS IN MEDICAL EXPERIMENTS. **Indian Journal of Pharmacology**, 34: 64-65, , 2002.

<http://medind.nic.in/ibi/t02/i1/ibit02i1p64.pdf>. Acesso em 12/07/2018.

FREY BN, ANDREAZZA AC, KUNZ M, GOMES FA, QUEVEDO J, SALVADOR M, GONCALVES CA, KAPCZINSKI F, Increased oxidative stress and DNA damage in bipolar disorder: a twin-case report. **Prog. Neuropsychopharmacol. Biol. Psychiatry**, 31 (2007) 283-285.

- FRIDOVICK I, Oxygen toxicity: a radical explanation. **J Exp Biol** 201, 1998, 1203-1209.
- GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evaluation of the medicinal plant *Chenopodium am brosioides* L. **Journal of Ethnopharmacology**. v.81, n.1, p.11-16, 2002.
- GALATI EM, MONDELLO MR, GIUFFRIDA D, DUGO G, MICELI N, PERGOLIZZI S, TAVIANO, MF. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. **J Agric Food Chem** 51:4903–4908. 2003.
- GALATI, E. M.; MONFORTE, M. T.; TRIPODO, M. M.; D'ÁQUINO, A.; MONDELLO, M. R. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. **Journal of Ethnopharmacology**, 83 (3), p. 229-233. 2001.
- GALATI, E.M., MONFORTE, M.T., TRIPODO, M.M., MONDELLO, M.R. Antiulcer activity on *Opuntia ficus indica* (l) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. **Journal of Ethnopharmacology**, 83 (3), p 229-233. 2005.
- GALEMBECK, E.; SANTORO, C. E.; ; KIMURA, E. K.; TAMASHIRO, J. Y.; GUERREIRO S. M. **Laminário virtual: Células vegetais**. Projeto Embrião - Universidade Estadual de Campinas. 2010. Disponível em: < <http://mecdb3.c3sl.ufpr.br:8080/xmlui/handle/123456789/17493> > Acesso em: 20 mar. 2016.
- GALENA. **Cacti-Nea™**: Nutracêutico do fruto de *Opuntia ficus-indica* com ação diurética e antioxidante. Boletim Técnico. 2006.
- GAUTHIER, C. The institutional animal care committee: keystone of international harmonization. **AATEX**, v. 14, p. 157-161, 2007. Special Issue.
- GAUTHIER, C.; GRIFFIN, G. Using animals in research, testing and teaching. **Rev. sci. tech.Off. int. Epiz**, v. 24, n. 2, p. 735-745, 2005.

GENTILE, C.; TESORIERE, L.; ALLEGRA, M.; LIVREA, M. A.; D'ALESSIO, P. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v.1028, p.481-486, 2004.

GLASL, H. Zur Photometric in der Drogenstandardisierung- 3. Gehaltsbestimmung von Gerbstoffdrogen. **Deutsche Apotheker Zeitung**, v. 123, p. 1979-1987, 1983.

GONTIJO, A. M. M. C.; TICE, R. **Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas**. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.;

GONZALEZ, FJ, JARABO, SMM. La chumbera como cultivo de zonas áridas. Madrid. Hojas Divulgadoras. n.90, p. 24, 1990.

GONZÁLEZ-PONCE, HAG, RINCÓN-SÁNCHEZ, AR, JARAMILLO-JUÁREZ, F, MOSHAGE, H. Natural Dietary Pigments: Potential Mediators against Hepatic Damage Induced by Over-The-Counter Non-Steroidal Anti-Inflammatory and Analgesic Drugs. **Nutrients** 2018, 10, 117; doi:10.3390/nu10020117.

GUNASEKARANA, V; RAJ, G.V; CHAND, P. A comprehensive review on clinical applications of comet assay. **J Clin Diagn Res**, v. 9, n. 3, p. GE01-5, 2015.

GUSTAVINO B., BUSCHINI A., MONFRINOTTI M., RIZZONI M., TANCIONI L., POLI P., ROSSI C. Modulating effects of humic acids on genotoxicity induced by water disinfectants in *Cyprinus carpio*. **Mutat Res.** 2005;587:103-113.

HABIG, W. H.; PABST, M. J.; JAKOBY, W. B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. **The Journal of biological chemistry**, v. 249, n. 22, p. 7130–7139, 1974.

HALLIWELL B, GUTTERIDGE JMC. **Free radicals in biology and medicine**. 4th ed. Oxford: University Press, 2007.

HALLIWELL, B., GUTTERIDGE, JMC. **Free Radicals in Biology and Medicine**. 5 ed. 2006.

- HARBORNE, J.B.; WILLIAMS, C.A. Advances in flavonoid research since 1992. **Phytochemistry**. v. 52, p. 481-504, 2000.
- HARBORNE, JB. **Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis**. 2nd ed. London: Chapman and Hill, 288 p. 1998.
- HARRABI B, ATHMOUNI K, HAMDAOUI L, BEN MAHMOUD L, HAKIM A, EL FEKI A, ZEGHAL K, GHOZZI H. Polysaccharides extraction from *Opuntia stricta* and their protective effect against HepG2 cell death and hypolipidaemic effects on hyperlipidaemia rats induced by high-fat diet. **Arch Physiol Biochem**. 2017 Oct;123(4):225-237. doi: 10.1080/13813455.2017.1307413.
- HASLER, C.M. Functional Foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technol.**, v.52, n.11, p.63-70, 2002.
- HASLER, C. M.; BLOCH, A.S. ; THOMSON, C.A.; ENRIONE, E.; MANNING, C. Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. **Journal of the American Dietetic Association**, 104(5): 814-826, 2004.
- HEDDLE, J. A. A rapid in vitro test for chromosomal damage. **Mutat. Res.**, 1973, 18: 187-190.
- HENRIQUES, J. A. P.; DAFREÉ, A. L.; PICADA, J. N.; MARIS, A. F.; SALVADOR, M. **Espécies Reativas de Oxigênio e Avaliação de Antioxidantes em Sistemas Biológicos**. In: Biotecnologia na Agricultura e na Agropecuária; Luciana Serafini, Neiva Barros e João Lúcio Azevedo (Ed.) Agropecuária, Instituto de Biotecnologia de Caxias do Sul. 2001.
- HISTER, C. A. L.; Genotoxicidade, citotoxicidade, compostos fenólicos e viabilidade polínica de *Psidium cattleianum* Sabine (MYRTACEAE). Universidade Federal de Santa Maria. 2015. Disponível em: Acesso em: 20 abr. 2016.
- HUNGENHOLTZ, J.; SMID, E. J. Nutraceutical production with food-grade microorganisms. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 13, p. 497-507, 2002.

- HWANG SH, KANG I-J, LIM SS. Antidiabetic Effect of Fresh Nopal (*Opuntia ficus-indica*) in Low-Dose Streptozotocin-Induced Diabetic Rats Fed a High-Fat Diet. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine : eCAM**. 2017;2017:4380721. doi:10.1155/2017/4380721.
- ISHURD O, ZGHEEL F, ELGHAZOUN M, ELMABRUK M, KERMAGI A, KENNEDY JF, KNILL CJ. A novel (1 - 4)- $\alpha$ -D-glucan isolated from the fruits of *Opuntia ficus indica* (L.) Miller. **Carbohydr Polym** 82:848–853. 2010.
- IVANOVA D. G., YANKOVA T. M. The free radical theory of aging in search of a strategy for increasing life span. **Folia Med (Plovdiv)**, 55(1): 33-41, 2013.
- JAESCHKE, H, BAJT, ML, Mechanisms of acetaminophen hepatotoxicity. **Comprehensive Toxicology**, 9, 2010, 457-473.
- KAMMANN, U.; BUNKE, M.; STEINHART, H. (2001). A permanent fish cell line (EPC) for genotoxicity testing of marine sediments with the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam. v. 498, p. 61-77, 2001.
- KANG, S. H.; et al. Recent Advances in In Vivo Genotoxicity Testing: Prediction of Carcinogenic Potential Using Comet and Micronucleus Assay in Animal Models. **Journal of Cancer Prevention**. v.18, n. 4, p. 277-288, 2013.
- KELLY, D. P. Cell biology: ageing theories unified. *Nature*, 470: 342–3, 2011.
- KHAN K, et al. Single-molecule DNA analysis reveals that yeast Hop1 protein promotes DNA folding and synapsis: implications for condensation of meiotic chromosomes. **ACS Nano**, 2012, 6(12):10658-66
- KIM, S. J.; RIM, K.T.; KANG, M. G.; KIM, J. K.; CHUNG, Y.; H. A Study of micronucleus induction with methyl formate and 2-methylbutane in bone marrow cells of male icr mice. **Safety and Health at Work**, v. 1, n. 1, 2015.
- KNASMÜLLER, S & MERSCH-SUNDERMANN, V & KEVEKORDES, S & DARROUDI, F & HUBER, WOLFGANG & HOELZL, C & BICHLER, J & MAJER, B.J. Use of human-

- derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants; Current state of knowledge. **Toxicology**. 2004, 198. 315-28. 10.1016/j.tox.2004.02.008.
- KONEMAN EW, ALLEN SD, JANDA WN, SCHRECKENBERGER PC, WINN JR WC. **Antimicrobial susceptibility testing**. In: **Color atlas and text book of diagnostic microbiology**. 5.ed. Philadelphia- New York: Lippincott. 1997.
- KUNST, L.R.; GARCIA, M. V.; MACHADO, A. D.; BARBISAN, F.; SILVEIRA, A. F. Otacoustic emissions and biomarkers of oxidative stress in students of a tabacco-producing region. **CoDAS**. 26 (3): 322-329, 2014.
- KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**. v. 12, p. 99-107, 2001.
- LAGOUGE, M.; LARSSON, N.G. The role of mitochondrial DNA mutations and free radicals in disease and ageing. *J. Intern. Med.*, 273(6): 529–543, 2013 .
- LEE, R, STEINERT, S. Use of the Single Cell Gel Electrophoresis/Comet Assay for Detecting DNA Damage in Aquatic (Marine and Freshwater) Animals. **Mutation research**. 544. 43-64. 2003. DOI:10.1016/S1383-5742(03)00017-6.
- LEITE JPV. **Fitoterapia: bases científicas e tecnológicas**. São Paulo: Atheneu; 2009.
- LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. Allium cepa test in environmental monitoring: a review. *Mutation Res*, v. 682, p. 71-81, 2009.
- LENAZ, G, D'AURELIO, M, MERLO PICH, M, GENOVA, ML, VENTURA, B, BOVINA, C, FORMIGGINI, G, PARENTI CASTELLI G. Mitochondrial bioenergetics in aging *Biochim. Biophys. Acta*, 1459, 2000, 397-404.
- LEO, M, BRUZUAL DE ABREU, M. PAWLOWSKA, AM., CIONI, L., BRACA, M. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus indica* flowers by HPLC-P-DA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. **Phytochemistry Letters** 3 (1), p48-52. 2010.
- LEUENBERGER, B. Interpretation and tipification of cactus *ficus-indica* L. and *Opuntia ficus indica* (L.) Miller (Cactaceae). **Taxon.**, 1991.

LEWINSKA, A; WNUK, M; SLOTA, E; BARTOSZ, G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**. 2007, 34, 781–786 doi: 10.1111/j.1440-1681.2007.04637.

LIS-BACHIN M, DEANS SG. Bioactivity of selected plant essential oils against *Listeria monocytogenes*. **J Appl Bacteriol** 82: 759-762. 1997.

MA, T-H.; XU, Z.; XU, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E.V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. The improved *Allium/Vicia* root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants, **Mutation Research/Environmental Mutagenesis and Related Subjects**, Amsterdam, v. 334, n. 2, p. 185-195, 1995.

MAES M, KUBERA M, LEUNIS JC, BERK M, GEFFARD M, BOSMANS E. In depression, bacterial translocation may drive inflammatory responses, oxidative and nitrosative stress (O&NS), and autoimmune responses directed against O&NS-damaged neoepitopes. **Acta Psychiatr Scand**. May;127 (5), 2013, 344-54.

MAES M, KUBERA M, MIHAYLOVA I, GEFFARD M, GALECKI P, LEUNIS JC, BERK M. Increased autoimmune responses against auto-epitopes modified by oxidative and nitrosative damage in depression: implications for the pathways to chronic depression and neuroprogression **J. Affect. Disord.**, 149, 2013, 23-29.

MANGGE H, ALMER G, TRUSCHNIG-WILDERS M, SCHMIDT A, GASSER R, FUCHS D, Inflammation, adiponectin, obesity and cardiovascular risk. **Curr. Med. Chem.**, 17, 2010, 4511-4520.

MANGGE H, HUBMANN H, PILZ S, SCHAUENSTEIN K, RENNER W, MARZ W. Beyond cholesterol-inflammatory cytokines, the key mediators in atherosclerosis **Clin. Chem. Lab. Med.**, 42, 2004, 467-474

MARIANO-COSTA, DE, RACACCINI, AMC, SANTANA, AP. Antimicrobial activity of yerba mate (*Ilex paraguariensis*) extract against microorganisms isolated from chicken meat. **Cienc. anim. bras.**, Goiânia, v.18, 1-7, e-42254, 2017, DOI: 10.1590/1089-6891v18e-42254.

MARKLUND, S.; MARKLUND, G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. **European Journal of Biochemistry / FEBS**, v. 47, n. 3, p. 469–474, 1974.

MARQUES, A. C. P. R., & RIBEIRO, M. Nicotina. In R. Laranjeira (Org.), **Usuários de substâncias psicoativas: abordagem, diagnóstico e tratamento** (pp. 49-58). São Paulo: CREMESP/AMP. 2003.

MARQUES, E. K. (Org.). **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Ulbra. p. 173-200, 2003.

MARQUES, R, MARREIRO, D.N. Metabolic and functional aspects of zinc in Down syndrome. **Rev. Nutr., Campinas**, 19(4):501-510, jul./ago., 2006.

MARTINS AB, SACRAMENTO LVS. **Análise microscópica e física para controle de qualidade primária de matéria prima vegetal pulverizada**. In: 16º Congresso de Iniciação Científica UNESP, Ilha Solteira, Brasil; 2004.

MATOS, F. J. A. **Introdução à Fitoquímica Experimental**. 2ed. Fortaleza: Edições UFC, 1997

MATSUMOTO ST, MANTOVANI MS, MALAGUTTI MIA, DIAS AL, FONSECA IC AND MARIN-MORALES MA. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberration in onion root-tips. **Genet Mol Biol**, 2006. 29:148-158.

MAURO, M.O.; PESARINI, J.R.; MARIN-MORALES, M.A.; MONREAL, M.T.F.D.; MONREAL, A.C.D.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA, R.J. Evaluation of the antimutagenic activity and mode of action of the fructooligosaccharide inulin in the meristematic cells of *Allium cepa* culture, **Genetics and Molecular Research**, Ribeirão Preto, v. 13, p. 4808-4819, 2014.

MAZZA, G. **Alimentos funcionales: aspectos bioquímicos y de procesado**, Zaragoza: Acribia, 457p, 2000.

- MELGAR,B; DIAS, MI; CIRIC, A; SOKOVIC, M; GARCIA-CASTELLO, EM; RODRIGUEZ-LOPEZ, AD; BARROS, L; FERREIRA, I. By-product recovery of *Opuntia* spp. peels: Betalainic and phenolic profiles and bioactive properties. **Industrial Crops & Products** 107: 353–359. 2017.
- MELLO JCP, PETROVICK PR. Quality control of *Baccharis trimera* (Less) DC (*Asteraceae*) hydroalcoholic extracts. **Acta Farm Bonaer.** 2000;19(3):211-5.
- MELLO, M.L.S.; VIDAL, B.C. A reação de Feulgen. **Ciência e Cultura** v.30, p.665-676, 1978.
- MENDES, A.S. Controle de qualidade em processo aplicado à manipulação magistral. **Revista Racine**, São Paulo, n. 57, p. 1-7, Jul/Ago. 2000.
- MICHELIN DC, FINATI SCG, SACRAMENTO LVS, VILEGAS W, SALGADO HRN. Controle de Qualidade da raiz de *Operculina macrocarpa* (Linn) Urb., *Convolvulaceae*. **Rev Bras Farmacogn.** 2010;20(1):18-22.
- MIGLIATO KF, MOREIRA RD, MELLO JCP, SACRAMENTO LVS, SALGADO HRN. Controle da qualidade do fruto de *Syzygium cumini* (L.) Skeels. **Rev Bras Farmacogn.** 2007;17(1):94- 101.
- MILLER W, ROSENBLOOM K, HARDISON RC, HOU M, TAYLOR J, RANEY B, BURHANS R, KING DC, BAERTSCH R, BLANKENBERG D, 28-way vertebrate alignment and conservation track in the UCSC Genome Browser. **Genome Res** 17: 1797–1808. 2007.
- MILNER, J.A. Molecular target for bioactive food components. **Journal of Nutrition**, 134 (9), 2492S-2498S. 2004.
- MOON, JK; SHIBAMOTO, T. Antioxidant Assays for Plant and Food Components. **J Agric Food Chem**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.
- MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

- MORALES, M. M. Métodos alternativos à utilização de animais em pesquisa científica: mito ou realidade? **Ciência e Cultura**, v. 60, n. 2, p. 33-36, 2008.
- MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **J. Immunol. Methods**. 65, 55-63, 1983.
- MOYER, R.A. et al. Anthocyanins, phenolics, and Antioxidants capacity in diverse small fruits: *Vaccinium*, *Rubus*, and *Ribes*. **J Agric Food Chem**, v.50, p.519-525, 2002.
- NATARAJAN, A.T. Chromosome aberration: past, present and future. **Mutation Research**, v.504, n.6, p. 3-16, 2002.
- NATURDATA. **Biodiversidade on line**. 2016. Disponível em: <http://naturdata.com/taxa>. Acesso em: 05/01/2018.
- NEVES, C. S.; *Pfaffia glomerata* Spreng. Pedersen (Ginseng brasileiro): Citogenotoxicidade no ensaio de *Allium cepa* L. Universidade Federal de Juiz de Fora/ JF. 2013. Disponível em: < <https://repositorio.ufjf.br/jspui/handle/ufjf/988> > Acesso em: 15 dez. 2017.
- OBIRO, WC; ZHANG, T; JIANG, B. The nutraceutical role of the Phaseolus vulgaris alpha – amylase inhibitor. **J. Nutr.**, v. 100, n. 1, p. 1-12, 2008.
- OECD, ORGANISATION FOR ECONOMIC CO-OPERATION AND DEVELOPMENT. Test No. 487: **In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test**. Disponível em: < [http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitromammalian-cellmicronucleus-test\\_9789264224438-en](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-487-in-vitromammalian-cellmicronucleus-test_9789264224438-en)>. Acesso em 28/11/2017.
- OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANFITH, J. P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. **Exptl. Cell Res.**, v. 198, p. 259-260, 1992.
- OLIVEIRA FP, LIMA EO, SIQUEIRA JÚNIOR JP, SOUZA EL, SANTOS BHC, BARRETO HM. Effectiveness of *Lippia sidoides* Cham. (*Verbenaceae*) essential oil in inhibiting the growth of *Staphylococcus aureus* strains isolated from clinical material. **Rev. Bras. Farmacogn** 16: 510-516. 2006b.

- OLIVEIRA RAG, LIMA EO, VIEIRA WL, FREIRE KRL, TRAJANO VN, LIMA, IO, SOUZA EL, TOLEDO MS, SILVA-FILHO RN. Estudo da interferência de óleos essenciais sobre a atividade de alguns antibióticos usados na clínica. **Rev. Bras. Farmacogn** 16: 77-82. 2006a.
- OLIVEIRA, FM, BARBOSA JUNIOR, F, JORDÃO JÚNIOR, AA, FOSS, NT, NAVARRO, AM, FRADE, MAC. Estresse oxidativo e micronutrientes na hanseníase. **Rev. Nutr** 28 (4), 2015, 349-357.
- OSTLING, O; JOHANSON, K.J. Microelectrophoretic Study of Radiation-Induced DNA Damages in Individual Mammalian Cells. **Biochemical and biophysical research communications**.1984, 123. 291-8. 10.1016/0006-291X(84)90411-X.
- PASTORE A, FEDERICI G, BERTINI E, PIEMONTE F. Analysis of glutathione: implication in redox and detoxification. **Clin Chim Acta**. 2003 Jul 1;333(1):19-39.
- PATEL, C., GARREC, J., DUPONT, C., AND DUMONT, E. What singles out the G[8-5]C intrastrand DNA cross-link? Mechanistic structural insights from quantum mechanics/molecular mechanics simulations. **Biochemistry** 52, 425–431. 2013. doi: 10.1021/bi301198h.
- PATEL, S. Reviewing the prospect of *Opuntia* pears as low cost functional foods. Reviews in **Environmental Science and Bio/Technology**. 2012. DOI:12. 10.1007/s11157-012-9295-6.
- PEREIRA, CD; MARTÍN-DIAZ, ML; CATHARINO, MG; CESAR, A; CHOUERI, RB; TANIGUCHI, S; ABESSA, DM; BÍCEGO, MC; VASCONCELLOS, MB; BAINY, AC; SOUSA, EC; DELVALLS, TS. Chronic contamination assessment integrating biomarkers responses in transplanted mussels-a seasonal monitoring. **Environment Toxicology**. Springer, São Paulo, v.27, n. 5, 257-67, 2012.
- PIMENTEL, B. M. V.; FRANCKI, M.; GOLLÜCKE, B. P. **Alimentos funcionais**: introdução as principais substâncias bioativas em alimentos. São Paulo: Editora Varela, 2005.
- PINHO, D. S.; STURBELLE, R. T.; ROTH, M. G. M.; GARCIAS, G. L.; Avaliação da atividade mutagênica da infusão de *Baccharis trimera* (Less.) DC. em teste de *Allium cepa*

e teste de aberrações cromossômicas em linfócitos humanos. **Rev Bras de Farmacog.** 2010.

PIRES, N. M. et al. Efeito do extrato aquoso de leucena sobre o desenvolvimento, índice mitótico e atividade da peroxidase em plântulas de milho. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, Lavras (MG), v. 13, n. 1, p. 55- 65, s./m, 2001.

POLETTO, P. O.; DINIZ, A. P.; BERNARDON, B.; ZAN, R. A.; RAMOS, L. J.; MENEGUETTI, D. U. O.; **Análise da mutagenicidade do extrato hidrossolúvel de *Derris rariflora* (MART. EX BENTH. J. F. MACBR: FABACEAE), Timbó amazônico, através do teste de micronúcleo em *Allium cepa*.** Faculdade de Educação e Meio Ambiente – FAEMA/Ariquemes/RO. 2011. Disponível em: < <http://www.periodicos.unir.br/index.php/propesq/article/viewFile/402/433> > Acesso em: 15 dez. 2016.

PORTIS, I. G.; FIGUEIREDO, F. R. G.; PENA, R. V.; HANUSCH, A. L.; SOUSA, L. P.; MACHADO, R. C.; SILVA, C. C.; CRUZ, A. D.; Bioensaio citogenético para a caracterização da mutagenicidade e citotoxicidade da espécie *Chochospermum regium*. **Revista Eletrônica da Faculdade de CERES.** 2016.

RABELLO-GAY MN, RODRÍGUEZ MALR E MONTELEONE-NETO R (eds) **Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese: Métodos e Critérios de Avaliação.** Sociedade Brasileira de Genética, Ribeirão Preto, pp 83-90. 1991.

RAMADAN MF, MÖRSEL JT. Recovered lipids from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill] peel: A good source of polyunsaturated fatty acids, natural antioxidant vitamins and sterols. **Food Chem.** 2003; 83(3):447-56. [https://doi.org/10.1016/S0308-8146\(03\)00128-6](https://doi.org/10.1016/S0308-8146(03)00128-6)

RANK J, NIELSEN MH. *Allium cepa* anaphase-telophase root tip chromosome aberration assay on N-methyl-N-nitrosourea, maleic hydrazide, sodium azide and ethyl methane sulfonate. **Mutat Res.** 1997;390(1-2):121–127.

RANK, J, NIELSEN, M. A. Screening of toxicity and genotoxicity in wastewater by the use of the *Allium test*. **Hereditas**, 1994: 121, no. 3, p. 249-254.

- REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRAS, A.; GONZÁLEZ, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Sciences**, v. 18, n. 5, p. 577-608, 1999.
- REININGHAUS EZ, ZELZER S, REININGHAUS B, LACKNER N, BIRNER A, BENGESSER SA, FELLENDORF FT, KAPFFHAMMER HP, MANGGE H. Oxidative stress in bipolar affective disorder. **Nervenarzt** Sep;85(9) (2014) 1099-107.
- RODRIGUES, F. C. M. P; LOPES, B. M. Potencial alelopático de *Mimosa caesalpinifolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v. 8, n. 1, p. 130-136, 2001.
- ROGERO, S O, et al. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Mat. Res.** vol.6 no.3 São Carlos Apr./June 2003.
- ROSA JCF, FIEGENBAUM M, SOLEDAR AL, CLAUS MS, NUNES ADS, CARDOSO VV. Cytogenetic evaluation and the association with polymorphisms the CPY1A1 and NR1I3 genes in individuals exposed to BTEX. **Environ Monit Assess.** 2012; 185(7):5883-90.
- ROVER JÚNIOR, L, VELLASCO, AP, HÖEHR. Sistema antioxidante envolvendo o ciclo metabólico da glutatona associado a métodos eletroanalíticos na avaliação do estresse oxidativo. **Quim. Nova** 24 (1), 2001. 112-119.
- SABHARWAL, R; VERMA, P; SYED, M.A; SHARMA, T; SUBUDHI, S.K; MOHANTY, S. Emergence of micronuclei as a genomic biomarker. **Indian J Med Paediatr Oncol**, v. 36, n. 4, p. 212-218, 2015.
- SALIM N. ABDELWAHEB C, RABAH C, ET AL. Chemical composition of *Opuntia ficus-indica* (L.) fruit. **African. J. Biotechnol.** 2009; 8(8):1623-24.
- SALOMON, L. S. **Contaminação microbiológica de produtos farmacêuticos**. Tese (Especialização em Microbiologia) - Instituto de Ciências Biológicas Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais. 2009.48p.
- SANTOS, R X et al. Avaliação da qualidade de amostras comerciais de chás na cidade de Vitória da Conquista-Bahia. **Revista Fitos Eletrônica**, [S.l.], v. 12, n. 1, p. 8-17, abr. 2018. ISSN 2446-4775. Disponível em: <<http://www.revistafitos.far.fiocruz.br/index.php/revista->

fitos/article/view/542>. Acesso em: 07 jun. 2018. doi:<http://dx.doi.org/10.5935/2446-4775.20180002>.

SBMCTA, Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (2004) **Orientações Básicas de Execução de Testes de Mutagenicidade para Proteção da Saúde Humana e do Meio Ambiente**.

<http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq = doc01>.

SCHERER, R.; GODOY, H.T. Antioxidant activity index (AAI) by 2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl method. **Food Chemistry**, v.112, n.3, p.654-8, 2009.

SILVA, A. A.; BOHM, F. M. L. Z.; Estudos dos efeitos do chá do *Agaricus blazei* (Cogumelo do sol) no índice mitótico das células meristemáticas do *Allium cepa* (Cebola). **Revista Diálogos & Saberes**, Mandaguari, v. 8, n. 1, p. 25-39, 2013.

SILVA, A.L.L.; ARAUJO, M.G.S.; BASTOS, M.L.A.; BERNARDO, T.H.L.; OLIVEIRA, J.F.S.; SILVA-JUNIOR, E.F.; SANTOS-JUNIOR, P.F.S.; ARAUJO, M.V.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; ARAÚJO-JÚNIOR, J.X.; VERISSIMO, R.C.S.S. Avaliação da atividade antibacteriana, citotóxica e antioxidante da espécie vegetal *Opuntia cochenillifera* (L.) Mill. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Campinas, v.18, n.1, supl. I, p.307-315, 2016. DOI 10.1590/1983-084X/ 15\_145.

SIMÕES, CAM, SCHENKEL, EP, GOSMANN, G., MELLO, JCP, MENTZ, LA, PETROVICK, PR. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 6 ed. Porto Alegre: UFRGS, Florianópolis: UFSC, 1102 p., 2007.

SINGH N. P., MCCOY M. T., TICE R. R., SCHNEIDER E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.** 1988 175 184–191 10.1016/0014-4827(88)90265-0.

SOARES, DG.; ANDREAZZA, AC.; SALVADOR, M. *Saccharomyces cerevisiae* as a biological model to evaluate the antioxidant capacity of compounds. **Rev. Bras. Farm.**, 85(2): 45-47, 2004.

SOHAL, RS. Role of oxidative stress and protein oxidation in the aging process. **Free Radical Biology and Medicine** 33 (1), 2002, 37-44.

SOUZA, CMM, SILVA, HR, VIEIRA-JUNIOR, GM, AYRES, MCC, COSTA, CLS, ARAÚJO, DS, CAVALCANTE, LCD, BARROS, EDS, ARAÚJO, PBM, BRANDÃO, MS, CHAVES, MH. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Quím. Nova** 30 (2), 2007, 351- 355.

SOUZA, SM, SILVA, PS, CAMPOS, JMS, VICCINI, LF. Cytotoxic and genotoxic effects of two medicinal species of *Verbenaceae*. **Caryologia**, 62. 2009.

SOUZA, M A F. **Dos laboratórios aos pontos de venda: uma análise da trajetória dos alimentos funcionais e nutracêuticos e sua repercussão sobre a questão agroalimentar**. Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2008. Tese de Doutorado. 289p.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**. v. 37, n. 2, p. 127-135, 2003.

SOUZA, S.A.M., STEIN, V.C., CATTELAN, L.V., BOBROWSKI, V.L., ROCHA, B.H.G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação de efeitos citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Belo Horizonte, v.5, n.1, 2005.

SOUZA, SAM. **Biotestes na avaliação da fitotoxicidade de extratos aquosos de plantas medicinais nativas do Rio Grande do Sul**. Pelotas, Monografia, Instituto de Biologia, Universidade Federal de Pelotas, 89 p, 2005.

SOUZA, V.C. & LORENZI, H. **Botânica sistemática**: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II. 2ª ed., Instituto Plantarum, Nova Odessa. 2008.

SOUZA-MOREIRA, T. M.; SALGADO, H. R. N. and PIETRO, R. C. L. R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. bras. farmacogn.** vol.20, n.3, 2010, pp.435-440. ISSN 0102-695X. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2010000300023>.

STANG A, WITTE I. Performance of the comet assay in a high-throughput version. **Mutat Res.** 2009; 675:5–10.

- STEVENSON D.E, HURST R.D. Polyphenolic phytochemicals-just antioxidants or much more? **Cell Mol Life Sci.** 2007. 64: 2900-2916.
- STINTZING FC, CARLE R. Cactus stems (*Opuntia* spp.): a review on their chemistry, technology, and uses. **Mol Nutr Food Res.** 2005 Feb;49 (2):175-94.
- TAKAHASHI, T. et al., Isolation and characterization of sake yeast mutants deficient in gamma-aminobutyric acid utilization in sake brewing. **J. Biosci. Bioeng** 97 (6): 412-8. 2004.
- TESORIERE L, FAZZARI M, ALLEGRA M, et al. Biothiols, taurine, and lipid-soluble antioxidants in the edible pulp of sicilian cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruits and changes of bioactive juice components upon industrial processing. **J Agric Food Chem.** 2005; 53(20):7851-5.
- THOMAS, P; WU, J; DHILLON, V; FENECH, M. Effect of dietary intervention on human micronucleus frequency in lymphocytes and buccal cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 69-76, 2011.
- TICE RR, AGURELL E, ANDERSON D, BURLINSON B, HARTMANN A, KOBAYASHI H, MIYAMAE Y, ROJAS E, RYU JC, SASAKI YF. Single cell gel/ Comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo. **Environ. Mol. Mutagen.** 2000; v.35: p. 206- 221.
- TYAKHT, AV; ILINA, EM; ALEXEEV, DM; ISCHENKO, DS; GORBACHEV, AY; SEMASHKO, TA; LARIN, AK; SELEZNEVA, OV; KOSTRYUKOVA, ES; KARALKIN, PA; VAKHRUSHEV, IV; KURBATOV, LK; ARCHAKOV, AI; GOVORUN, VM. RNA-Seq gene expression profiling of HepG2 cells: the influence of experimental factors and comparison with liver tissue. **BMC Genomics.** 2014, 15:1108. doi.org/10.1186/1471-2164-15-1108
- UHL M, HELMA C AND KNASMULLER S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma (HepG2) cells. **Mutat Res** 468:213-225. 2000.
- UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Field Guide for Managing Prickly Pear in the Southwest.** Revised June 2017. Disponível em: [https://www.fs.usda.gov/Internet/FSE\\_DOCUMENTS/fseprd563039.pdf](https://www.fs.usda.gov/Internet/FSE_DOCUMENTS/fseprd563039.pdf). Acesso 05/01/2018.

- VALENTE, LMM; PAIXÃO, D; NASCIMENTO, AC; SANTOS, PFP; SCHEINVAR, LA; MOURA, MRL; TINOCO, LW; GOMES, LNF; SILVA, JFM. Antiradical activity, nutritional potential and flavonoids of the cladodes of *Opuntia monacantha* (Cactaceae). **Food Chemistry**, 123(4), 1127-1131. 2010. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.05.074>.
- VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J, CRONIN MT, MAZUR M, TELSER J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **Int J Biochem Cell Biol**. 39 (1), 2006, 44-84.
- VASCONCELOS, SML, MOURA, JBF, BENFATO, MS, MANFREDINI, V, KUBOTA, LT, GOULART, MOF. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Quím. Nova** 30 (5), 2007, 1323-1338.
- VICENTINI, V.E.P.; CAMPAROTO, M.L.; TEIXEIRA, R.O.; MANTOVANI, M.S. Averrhoa carambola L., *Syzygium cumini* (L.) Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and animal test systems. **Acta Scientiarum**, Maringá, v. 23, p. 593-598, 2001.
- WALZEM, R. L. Functional Foods. **Trends in Food Science and Technology**. v. 15, p. 518, 2004.
- WHITE, PA; RASMUSSEN, JB. The genotoxic hazards of domestic wastes in surface Waters. **Mutation Research**, 1998, 410 1998 223–236.
- WOLFRAM, RM, KRITZ, H, ETHIMIOU, Y, STOMATOPOULOS, J, SINZINGER, H. Effect of pear (*Opuntia robusta*) on glucose and lipidic metabolism in nondiabetics with hyperlipidemia: a pilot study. **Wien Klin Wochenschr**, 114, 840-846.
- WORLD HUMAN ORGANIZATION. **Quality Control methods for medicinal plants materials**. Geneva; 1998.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diet, nutrition and prevention of chronic diseases**. Geneva: WHO; 2003. (Technical Report Series, 916).

WORLD HUMAN ORGANIZATION. **Guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues.** Geneva; 2007.

YOO, H. et al. Anti-inflammatory effects of rutin on HMGB1-induced inflammatory responses in vitro and in vivo. **Inflammation Research**, v. 63, p. 197-206, 2014.

ZARONI M, PONTAROLO R, ABRAHÃO WSM, FÁVERO MLD, CORREA JUNIOR C, STREMEL DP. Qualidade microbiológica das plantas medicinais produzidas no Estado do Paraná. **Rev Bras Farmacogn** 14: 29-39. 2004.