



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOQUÍMICA E FISIOLOGIA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA,
ANTIOXIDANTE E TOXICIDADE AGUDA DA MUCILAGEM
DE PALMA FORRAGEIRA (*Opuntia ficus indica*)**

CAMILA DOS SANTOS SILVA

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva
Co-orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Barros Pimentel

RECIFE-PE

2015

CAMILA DOS SANTOS SILVA

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA, ANTIOXIDANTE
E TOXICIDADE AGUDA DA MUCILAGEM DE PALMA
FORRAGEIRA (*Opuntia ficus indica*)**

Dissertação apresentada para o
cumprimento parcial das
exigências para obtenção do título
de Mestre em Bioquímica e
Fisiologia pela Universidade
Federal de Pernambuco

Orientadora: Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva

Co-orientadora: Profa. Dra. Maria do Carmo Barros Pimentel

RECIFE-PE

2015

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Silva, Camila dos Santos

Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e toxicidade aguda da mucilagem de palma forrageira (*Opuntia ficus indica*)/ Camila dos Santos Silva– Recife: O Autor, 2015.

106 folhas : il., fig., tab.

Orientadora: Maria da Paz Carvalho da Silva

Coorientadora: Maria do Carmo Barros Pimentel

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Ciências Biológicas. Bioquímica e Fisiologia, 2015.

Inclui referências

- 1. Fitoquímicos 2. Cacto 3. Testes de toxicidade I. Silva, Maria da Paz Carvalho da (orientadora) II. Pimentel, Maria do Carmo Barros (coorientadora) III. Título**

572.2

CDD (22.ed.)

UFPE/CCB-2016-187

CAMILA DOS SANTOS SILVA

“Avaliação da atividade antimicrobiana, antioxidante e toxicidade aguda da mucilagem de palma forrageira (*Opuntia ficus indica*)”

Dissertação apresentada para o cumprimento parcial das exigências para obtenção do título de Mestre em Bioquímica e Fisiologia pela Universidade Federal de Pernambuco

Aprovado por:

Profa. Dra. Maria da Paz Carvalho da Silva - Presidente

Dra. Mônica Cristina Barroso Martins

Dr. Roberto Afonso da Silva

Dra. Mariana Paola Cabrera

Data: 28/08/2015

Dedico este trabalho a toda minha família, em especial, a minha mãe Severina por todo carinho, dedicação, presença e apoio e ao meu pai Milton (*in memorian*), que descance na graça de Deus, pelo pai maravilhoso e dedicado que sempre foi por sempre acreditar nos meus sonhos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ser minha fortaleza e ter me dado força, coragem, perseverança e muita fé para acreditar na realização deste sonho dia após dia;

Agradeço de todo o coração aos meus pais por me apoiarem na realização dos meus desejos e depositar em mim toda confiança, carinho e muitas vezes se desdobrando para que meus sonhos se tornassem realidade. Meu eterno amor e gratidão. Essa conquista é de vocês!

Aos meus familiares (irmãos, tios, tias, primos e primas) por todo carinho que sempre demonstraram por mim;

À minha orientadora Maria da Paz pela competência científica e acompanhamento do trabalho, pelo apoio, incentivo e disponibilidade demonstrada em todas as fases para conclusão desse estudo;

À minha co-orientadora Maria do Carmo pela total disponibilidade e apoio, pelos comentários e sugestões, que permitiram encontrar informações e soluções que em muito contribuíram para o meu crescimento científico;

À veterinária Maria Helena pela ajuda nos experimentos com os ratos que foi de suma importância para concretização deste trabalho;

Ao professor Eduardo Beltrão e seu aluno doutorando Arthur Clark que me orientaram na leitura das lâminas histológicas;

Ao professor Pabyton, pelos conselhos valiosíssimos e pela ajuda com a estatística do meu trabalho;

Ao pós-doutorando Roberto Afonso, pela contribuição prestada nos momentos de dificuldade dos experimentos e conselhos;

A Profa. Norma e a todos do Departamento de Antibióticos, pela forma carinhosa e hospitaleira com que me receberam;

Ao Sr. João pela ajuda valiosíssima e pela amizade;

Aos doutores/professores da banca por terem aceitado estar presente na defesa e contribuírem para a finalização deste trabalho;

Aos meus amigos que mesmo na distância do dia a dia estão sempre comigo;

As “Pimentinhas” minhas amigas, parceiras e companheiras de laboratório Amanda e Tatyane, pelos bons e divertidos momentos de convivência e pela ajuda durante esta jornada.

A Djalma pela atenção e colaboração, sempre disposto a nos ajudar e pela amizade;

Ao LIKA por disponibilizar sua estrutura;

Aos colegas da Biotecnologia do LIKA, por toda amizade;

À Universidade Federal de Pernambuco, em especial à Coordenação e aos professores da Pós-Graduação em Bioquímica e Fisiologia, pela qualificação acadêmica, pelo esforço e dedicação para o sucesso do programa;

Enfim, a todos aqueles que colaboraram de forma direta ou indireta, os quais, por um lamentável equívoco, deixaram de ser aqui mencionados, mas que tiveram importante participação na realização deste trabalho.

MEUS SINCEROS AGRADECIMENTOS.

"De tudo, ficaram três coisas:
A certeza de que estamos sempre começando;
A certeza de que precisamos continuar;
A certeza de que seremos interrompidos antes de terminar;
Portanto devemos:
Fazer da interrupção um caminho novo;
Da queda um passo de dança;
Do medo, uma escada;
Do sonho, uma ponte;
“Da procura, um encontro”.
“O homem é do tamanho do seu sonho”

Fernando Pessoa.

RESUMO

Nas últimas décadas tem-se verificado avanços significativos envolvendo estudos fitoquímicos e farmacológicos de plantas medicinais visando obter novos compostos com propriedades terapêuticas. A palma forrageira, *Opuntia ficus indica* (Cactaceae), é rica em hidratos de carbono complexos (fibras solúveis, mucilagens, celulose) polifenóis (em particular flavanóides, como quercetina e kaempferol), carotenoides, vitaminas C e E entre outros, fazendo com que esta planta apresente várias propriedades terapêuticas. O presente trabalho teve como objetivo detectar compostos fenólicos, avaliar a atividade antimicrobiana e antioxidante, como também a toxicidade aguda em ratos *Wistar* da mucilagem de cladódios de *Opuntia ficus indica*. A princípio foi realizada dosagem de compostos fenólicos (polifenóis e flavonoides). A atividade antimicrobiana foi realizada pelo método de microdiluição em placa de 96 poços para determinar a CMI (concentração mínima inibitória) e CMB/CMF (concentração mínima bactericida ou fungicida), os seguintes micro-organismos foram utilizados: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538); *Micrococcus luteus* (ATCC2225); *Bacillus subtilis* (UFPEDA-16); *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA-39); *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71); *Enterococcus faecalis* (ATCC6057); *Escherichia coli* (ATCC25922); *Serratia* sp (UFPEDA-398); *Candida albicans* (UFPEDA-1007); *Staphylococcus aureus* (CI, 731-UFPEDA, Secreção de ferida-HC, ORSA), *Pseudomonas aeruginosa* (CI, 736-UFPEDA, Secreção de ferida -HC), *Enterobacter aerogenes* (CI, 739-UFPEDA, Secreção de ferida -HC), o extrato foi testado com concentrações entre 2000 a 3,9 µg/ml. A atividade antioxidante foi detectada pelo método ABTS, DPPH e capacidade antioxidante total. A toxicidade letal foi estimada usando *Artemia salina* e para a determinação da toxicidade aguda (*in vivo*) foram utilizados ratos *Wistar*, machos, que receberam por via oral a dose única de 2000 mg/kg da mucilagem de palma forrageira e foram avaliados por um período de 14 dias. Os resultados demonstraram que o conteúdo de polifenóis foi de $64,9 \pm 0,6$ µg/ml e flavonoides $31,8 \pm 0,4$ µg/ml. Resultados significativos foram encontrados para a atividade antioxidante: a percentagem de inibição ABTS foi $98,40 \pm 0,40\%$ após 120 min, equivalentes ao TEAC de $2.173,30 \pm 8,80$ µM Trolox, percentagem de inibição da formação de radicais DPPH foi $64,03 \pm 7,8\%$ e capacidade antioxidante total foi $48,42 \pm 0,3\%$ equivalente ao ácido ascórbico e $67,2 \pm 0,4\%$ equivalente ao ácido gálico. A mucilagem de palma forrageira mostrou atividade antimicrobiana contra: *Micrococcus luteus* (CMI= 1000 µg/ml e CMB= 2000 µg/ml), *Mycobacterium smegmatis* (CMI= 500 µg/ml e CMB= 2000µg/ml); *Pseudomonas aeruginosa* e *Pseudomonas aeruginosa* – IC ambas exibiram CMI de 2000 µg/ml e não apresentaram CMB. A mucilagem também foi ativa contra *Candida albicans* (CMI= 1000 µg/ml e CMF= 2000µg/ml). A toxicidade letal (CL₅₀) para *Artemia salina* foi 584,11 µg/ml. No teste de toxicidade aguda *in vivo* não mostrou sinais de intoxicação e nem alterações fisiológicas, com DL₅₀ (dose letal mediana) estimada maior que 2000 mg/kg (classe GHS 5 da OECD). A partir dos resultados obtidos, concluiu-se que a planta estudada é uma potencial fonte de compostos bioativos, sendo promissores em estudos visando à obtenção de novos agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais com baixa toxicidade.

Palavras-chave: *Opuntia ficus indica*; atividade antioxidante; atividade antimicrobiana; toxicidade aguda.

ABSTRACT

In recent decades there has been significant progress involving pharmacological and phytochemical studies of medicinal plants in order to obtain new compounds with therapeutic properties. The fodder palm, *Opuntia ficus indica* (Cactaceae), is rich in complex carbohydrates (soluble fiber, mucilage, cellulose) polyphenols (particularly flavonoids, such as quercetin and kaempferol), carotenoids, vitamins C and E among others, making this plant present various therapeutic properties. This study aimed to detect phenolic compounds, evaluate the antimicrobial and antioxidant activities, as well as acute toxicity of the *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage in Wistar rats. Firstly, it was held dosage of phenolic compounds (polyphenols and flavonoids). The antimicrobial activity was performed using the microdilution method in 96-well plate to determine the MIC (minimum inhibitory concentration) and MBC/MFC (minimum bactericidal or fungicidal concentration), the following microorganisms were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538); *Micrococcus luteus* (ATCC2225); *Bacillus subtilis* (UFPEDA-16); *Pseudomonas aeruginosa* (UFPEDA-39); *Mycobacterium smegmatis* (UFPEDA-71); *Enterococcus faecalis* (ATCC6057); *Escherichia coli* (ATCC25922); *Serratia* sp (UFPEDA-398); *Candida albicans* (UFPEDA-1007); *Staphylococcus aureus* (CI, 731-UFPEDA, Wound secretion-HC, ORSA), *Pseudomonas aeruginosa* (CI, 736-UFPEDA, Wound secretion -HC), *Enterobacter aerogenes* (CI, 739-UFPEDA, Wound secretion -HC), the extract was tested at concentrations between 2000 to 3.9 µg/ml. Antioxidant activity was detected by the method ABTS, DPPH and total antioxidant capacity. Lethal toxicity was estimated using *Artemia salina* and to determine the acute toxicity (*in vivo*) were used male Wistar rats that were orally administered a single dose of 2000 mg/kg of fodder palm mucilage and were evaluated for a period 14 days. The results showed that the polyphenol content was 64.9 ± 0.6 µg/ml and flavonoids 31.8 ± 0.4 µg/ml. Significant results were found for the antioxidant activity: percent inhibition ABTS was $98.40 \pm 0.40\%$ after 120 min, equivalent to TEAC 2173.30 ± 8.80 µM Trolox, percentage of inhibition of DPPH was $64.03 \pm 7.8\%$ and total antioxidant capacity was $48.42 \pm 0.3\%$ equivalent to ascorbic acid and $67.2 \pm 0.4\%$ equivalent to gallic acid. The fodder palm mucilage showed antimicrobial activity against: *Micrococcus luteus* (MIC = 1000 µg/ml and MBC = 2000 µg/ml) *Mycobacterium smegmatis* (MIC = 500 µg/ml and MBC = 2000 µg/ml); *Pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas aeruginosa* - IC exhibited both MIC 2000 µg/ml and not present MBC. The mucilage was also active against *Candida albicans* (MIC = 1000 µg/ml and MFC = 2000 µg/ml). The lethal toxicity (LC₅₀) for *Artemia salina* was 584.11 µg/mL. In the *in vivo* acute toxicity test showed no signs of intoxication nor physiological alterations, with LD₅₀ (median lethal dose) estimated greater than 2000 mg/kg (class 5 GHS the OECD). From the results, it was concluded that the plant studied is a potential source of bioactive compounds, with promising studies in order to obtain new antimicrobial agents and natural antioxidants with low toxicity.

Word Keys: *Opuntia ficus indica*, antioxidant activity, antimicrobial activity; acute toxicity.

LISTA DE FIGURAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Figura 1. Plantação de <i>Opuntia ficus indica</i> em Caruaru – PE.....	22
Figura 2. Flor da palma forrageira.....	23
Figura 3. Diversos frutos da palma forrageira.....	24
Figura 4. Fluxograma do teste de toxicidade aguda, pelo método de classes, iniciando com dose de 2000 mg/kg.....	41

CAPÍTULO 1

Figure 1 Antioxidant activity of OFCM measured by the DPPH radical-scavenging method. gallic acid (1 mg/ml) and Quercetin (1 mg/ml) was used as positive control. Each absorbance value represents the average of triplicates of different simple analyzed.* significantly different $p < 0.05$	78
Figure 2 Lethal cytotoxicity assay (LC_{50}) of OFCM against <i>Artemia salina</i> . (*) = showed statistically significant differences in relation to the control.....	79

CAPÍTULO 2

Figure 1 Mean body weight of male <i>Wistar</i> rats treated orally with <i>Opuntia ficus indica</i> cladodes mucilage for toxicological assessment. * $p < 0.05$ compared with the control group (distilled water). Values expressed as mean $\pm$ SD, $n = 9$ animals/ group.....	102
Figure 2 (A and B) Photomicrograph of kidney section from experimental group (OFCM-treated) on day 14 of acute toxicity test showing apparently normal glomerulus (G) and renal tubules with tubular epithelial cells (arrow). HE (x100, x400, respectively). (C and D) Photomicrograph of kidney section from control group (distilled water) after 14 days also showing the glomerulus (G) and renal tubules with tubular epithelial cells (arrow). HE (x100, x400, respectively).....	103
Figure 3 (A and B) Photomicrograph of liver section from experimental group (OFCM-treated) on day 14 of acute toxicity test showing tissue integrity and hepatocytes (h). HE (x100, x400, respectively). (C and D) Photomicrograph of liver section from control group (distilled water) after 14 days also showing tissue integrity and hepatocytes (h). HE (x100, x400, respectively).....	104

LISTA DE TABELAS

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Tabela 1 Usos e aplicações potenciais da palma forrageira.....	26
Tabela 2 Espécies reativas de oxigênio (EROs).....	35
Tabela 3 Classificação de risco toxicológico agudo segundo o GHS (<i>Globally Harmonised System</i>).....	40

CAPÍTULO 1

Table 1 Contents of total phenols and flavonoids in OFCM.....	74
Table 2 Antioxidant activity of OFCM using ABTS ⁺	75
Table 3 Percentage of antioxidant activity of OFCM by the method of DPPH and total antioxidant capacity.....	76
Table 4 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC/MFC) of OFCM and reference drugs tested on twelve microorganisms.....	77

CAPÍTULO 2

Table 1 Acute oral toxicity of <i>Opuntia ficus indica</i> cladodes mucilage in Wistar rats.....	97
Table 2 Water consumption, food intake and urine and feces production of rats treated orally with <i>Opuntia ficus indica</i> cladodes mucilage.....	98
Table 3 Hematological parameters of rats treated orally with <i>Opuntia ficus indica</i> cladodes mucilage.....	99
Table 4 Biochemical parameters of rats treated orally with <i>Opuntia ficus indica</i> cladodes mucilage.....	100
Table 5 Relative organ weights of male rats treated orally with <i>Opuntia ficus indica</i> cladodes mucilage.....	101

LISTA DE ABREVIATURAS

ABTS – 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid

ALB – albumin

AlCl₃ - Aluminium chloride

ALP – alkaline phosphatase

ALT – Alanine aminotransferase

AMY – Amylase

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

AscAE – ascorbic acid equivalent

AST – aspartate aminotransferase

ATCC – American Type Culture Collection

BASO – Basophils

BST – Brine shrimp lethality test

C. albicans – *Candida albicans*

CBM – Concentração Bactericida Mínima

CI – Clinical isolates

CIM – Concentração Inibitória Mínima

CL₅₀ – Concentração letal mediana

CLSI – Clinical Laboratory Standards Institute

CREA – Creatinine

D-BIL – Direct bilirubin

DL₅₀ – Dose letal mediana

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucléico

DPPH – 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl

EDTA – Ethylene diamine tetraacetic acid

EO – Eosinophils

EROs – Espécies reativas de oxigênio

EUA – Estados Unidos da América

FRS – Free radical scavenging

GAE – Gallic acid equivalent

GHS – Globally Harmonised System

GLU – Glucose

HC – Hospital das Clinicas

HCT – Hematocrit

HDL – high density lipoprotein

HE – Hematoxylin and eosin

HGB – Hemoglobin

I-BIL – Indirect bilirubin

IPA – Instituto de Pesquisa Agropecuária

LDH – Lactate dehydrogenase

LDL – low density lipoprotein

LIKA – Laboratório de Imunopatologia KeizoAsami

LYM – lymphocytes

MCB – Minimum bactericidal concentration

MCH – mean corpuscular hemoglobin

MCHC – Mean corpuscular hemoglobin concentration

MCV – Mean corpuscular volume

MFC – Minimum fungicidal concentration

MIC – Minimum inhibitory concentration

MONO – Monocytes

Na₂CO₃ – Sodium carbonate

NCCLS – National Committee for Clinical Laboratory Standards

NEUT – Neutrophils

OECD – Organization for Economic Cooperation and Development

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORSA – *Staphylococcus aureus* Oxacillin resistant

PNPMF – Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas

PLT – Platelet

QE – Quercetin equivalent

RBC – red blood cell count

RDC – Resolução da Diretoria Colegiada

ROS – Reactive oxygen species

RL – Radicais livres

S. aureus – *Staphylococcus aureus*

SEBREA/PB - Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas/ Paraíba

SUS – Sistema Único de Saúde

TAC – Total antioxidant capacity

T-BIL – total bilirubin

TC – total cholesterol

TEAC – Trolox Equivalent Antioxidant Capacity

TG – triglyceride

TP – total protein

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco Departamento de Antibióticos

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

URE – Urea

URI AC – Uric Acid

VLDL – Very low density lipoprotein

WBC – White blood cell count

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1. <i>Opuntia ficus indica</i> (L.) Mill	21
2.1.1 Origem, habitat e distribuição geográfica	21
2.1.2 Morfologia, fisiologia e composição química	22
2.1.3 Principais usos	25
2.1.4 Palma forrageira na alimentação humana	27
2.2 Plantas medicinais	29
2.3 Antimicrobianos	31
2.4 Antioxidantes	34
2.5 Toxicidade	37
2.5.1 Ensaio com <i>Artemia salina</i> Leach	38
2.5.2 Toxicidade Aguda	39
3. OBJETIVOS	42
3.1. Geral	42
3.2. Específicos	42
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	43
5. CAPÍTULO 1	55
Bioactivity assessment: antimicrobial and antioxidant activities of mucilage from fodder palm (<i>Opuntia ficus indica</i> L. Mill) cladodes	55
Abstract	56
1. Introduction	57
2. Materials and methods	59
2.1 Chemicals	59
2.2 Plant material and preparation of the mucilage	59
2.3. Determination of total phenolic content	59
2.4 Determination of total flavonoid content	59
2.5 Antioxidant activity	60
2.5.1 Antioxidant activity using 2,2-azino-bis-(3 ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid (ABTS)	60
2.5.2 DPPH radical scavenging assay	60
2.5.3 Total antioxidant capacity (TAC)	61
2.6. Antimicrobial activity assay	61

2.6.1. Microorganisms.....	61
2.6.2 Determination of Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC/MFC)	61
2.6.3. Standard drugs used for antimicrobial assay.....	62
2.7 Brine shrimp lethality test (BST) with <i>Artemia salina</i> Leach.	62
2.8 Statistical analysis	63
3. Results.....	63
3.1. Total phenolic and flavonoid contents.....	63
3.2 Evaluation of OFCM antioxidant activity	63
3.2.1 Radical cation ABTS ⁺ scavenging activity	63
3.2.2 DPPH radical-scavenging activity	64
3.2.3 Total antioxidant activity.....	64
3.3 Evaluation of OFCM Antimicrobial activity	64
3.4 The cytotoxicity assay (LC ₅₀) using <i>Artemia salina</i>	65
4. Discussion	66
5. Conclusion	69
Acknowledgement.....	69
Conflict of interest	69
References.....	70
Table legends.....	73
Figure legends	73
6. CAPÍTULO 2.....	80
Toxicological evaluation of mucilage from fodder palm (<i>Opuntia ficus indica</i> L. Mill) cladodes	80
Abstract.....	81
1. Introduction	81
2. Materials and methods.....	83
2.1 Plant material and preparation of the mucilage.....	83
2.2 Experimental animals and housing conditions	83
2.3 Acute oral toxicity study in rats	84
2.3.1 Experimental design.....	84
2.3.2 Evaluated parameters	84
2.3.2.1 Hippocratic screening.....	84
2.3.2.2 Physiological informations.....	85

2.3.2.3 Urine examination	85
2.3.2.4 Hematology and serum biochemistry	85
2.3.2.5 Macroscopic examination and organ weights	86
2.3.2.6 Histopathological analysis.....	86
2.3.3 Statistical analysis.....	87
3. Results.....	87
3.1 Acute toxicity study	87
3.2 Physiological information	87
3.3 Urine examination	88
3.4 Hematological analysis.....	88
3.5 Biochemical analysis.....	88
3.6 Macroscopic examination and relative organ weights	88
3.7 Histopathology	89
4. Discussion	89
5. Conclusion	92
6. Conflict of interest	92
7. Acknowledgement.....	92
8. References.....	92
Table legends.....	96
Figure legends	96
7. CONCLUSÕES.....	105
8. PERSPECTIVAS.....	106

1. INTRODUÇÃO

O uso de plantas no tratamento e na cura de enfermidades é tão antigo quanto à espécie humana (TAKAMURA, 2008). O Brasil possui uma grande diversidade vegetal, contando com aproximadamente 35 mil espécies distribuída em seus biomas (FORZZA et al., 2013), porém apenas 17% delas são exploradas para pesquisas de compostos biologicamente ativos (POLITI; PIETRO; MOREIRA, 2009; RODRIGUES et al., 2013).

Os fitoterápicos podem atuar como forma opcional de terapêutica, levando em consideração o menor custo, cujos benefícios adicionam-se aos da terapia convencional. Para tanto são necessários maiores investimentos para estudos científicos nessa área, de maneira a levar à comprovação da eficácia dessas espécies, garantindo a segurança na aplicação por parte dos profissionais de saúde (BORGES et al., 2008).

A utilização de produtos de origem vegetal é crescente em todo o mundo, principalmente devido aos problemas que são atribuídos aos produtos sintéticos que ocasionam danos tanto para a saúde quanto para o meio ambiente (MACHADO; FERNANDES JÚNIOR, 2011). Em comprovação a isso, estudos relatam que dos 520 novos medicamentos aprovados entre 1983 e 2010; 39% eram produtos naturais ou derivados de produtos naturais (NEWMAN; CRAGG, 2010).

Uma vez que as plantas medicinais produzem uma variedade de substâncias com propriedades antimicrobianas, é esperado que estudos de fitoquímica e isolamento possam indicar compostos candidatos para o desenvolvimento de novos antibióticos (DUARTE, 2006).

Atualmente, diversas pesquisas de extratos vegetais com ação antibacteriana tem-se apresentado como uma alternativa para o combate dos micro-organismos, devido à resistência destes as múltiplas drogas, dessa maneira tem se realizado buscas contínuas de novos produtos antibacterianos que sejam eficazes e econômicos para combater infecções por micro-organismos patogênicos (PALMEIRA et al., 2010). As plantas com maior atividade antimicrobiana e antioxidante são aquelas ricas em polifenóis, flavonoides e taninos (DOUGHARI; EL-MAHMOOD; TYOYINA, 2008).

Antimicrobianos de origem vegetal apresentam enorme potencial terapêutico, sendo eficazes para o tratamento de doenças infecciosas, ao mesmo tempo em que minimizam muitos dos efeitos colaterais que são frequentemente associados com agentes antimicrobianos sintéticos (RAVISHANKAR et al., 2012, CAILI; HUAN; QUANHONG, 2006; AL-BAKRI; AFIFI, 2007).

Neste contexto, pesquisas direcionadas a investigar os compostos químicos e avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante de plantas medicinais tornam-se oportuno, principalmente pelo grande número de pessoas com doenças associadas com a ação de radicais livres e doenças infecciosas causadas por micro-organismos (UCHÔA, 2014).

Ainda que evidenciada a atividade biológica dos fitoterápicos por comunidades, fazem-se necessários maiores estudos sobre a sua atividade tóxica e medicinal, para que deste modo, seja possível a elaboração e o desenvolvimento de novas drogas produzidas por meio dos produtos naturais, bem como, o seu consumo de forma segura pela população (GONÇALVES, 2014).

A *Opuntia ficus indica* (L.) Mill., conhecida popularmente no Brasil como palma forrageira, é uma cactácea originária das regiões áridas Mexicanas que está disseminada na América do Sul e Central, Austrália, África do Sul e em toda a Região Mediterrânea (Leo et al., 2010). Os principais constituintes dos cladódios de *Opuntia ficus indica* são carboidratos complexos (por exemplo, fibra solúvel, celulose, mucilagem) (TROMBETTA et al., 2006) e a presença de ácidos urônicos (RIBEIRO et al., 2010). Presente também em sua composição polifenóis (em particular alguns flavonoides, como a quercetina, kaempferol, taxifolina (STINTZING; CARLE, 2005). Ainda tem algumas classes de lipídeos (ácidos graxos e esteróis), glutatona, vitaminas C e E, carotenóides (PÂNICO et al., 2007) e minerais (MALAININE et al., 2003).

A palma é considerada um alimento importante em vários países, especialmente os localizados na América do Sul, no Mediterrâneo e África do Sul. Com uso de plantas na manipulação de fitoterápicos, o Brasil teria muitas vantagens, como a redução da importação de medicamentos, fomentando assim, a autossuficiência e fornecendo à população um maior número de medicamentos e uma maior valorização das tradições populares.

Considerando que de acordo com a literatura, *Opuntia ficus indica* é rica em flavonoides e que estes metabólitos secundários estão envolvidos em diversas funções como: proteção contra a incidência de raios ultravioleta, proteção contra micro-organismos patogênicos, ação antioxidante e inibição enzimática (Machado et al., 2008); este trabalho objetivou avaliar o potencial antimicrobiano e antioxidante, como também, verificar possíveis efeitos tóxicos da mucilagem de palma forrageira em ratos machos *Wistar*.

2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1. *Opuntia ficus indica* (L.) Mill

2.1.1 Origem, habitat e distribuição geográfica

A *Opuntia ficus indica* pertence à família das cactáceas que compreende cerca de 200-300 espécies, originária da região central do México, país que apresenta a maior diversidade de cactos do mundo (MENEZES; SIMÕES; SAMPAIO, 2005; SÁENZ, C et al., 2006; LÓPEZ; ITA; VACA, 2009). Desde o período pré-hispânico a *Opuntia* spp. é utilizada pelos mexicanos havendo sua intensa comercialização durante o período asteca, o que tornou esse vegetal destaque na economia agrícola (BETANCOURT- DOMÍNGUEZ et al., 2006). É cultivada em mais de 30 países nos dois hemisférios e em todos os continentes, exceto na Antártida (INGLESE; BASILE; SCHIRRA, 2002), encontrando-se amplamente distribuída pela América Central, América do Sul, Austrália, África do Sul (LEO et al., 2010) e países mediterrâneos (ROGER, 2008).

É uma planta tropical ou subtropical que cresce de forma selvagem em regiões áridas e semiáridas de todo o mundo (ENNOURI et al., 2006), devido ao fato de possuir mecanismos adaptativos especiais e elevada capacidade de produção de biomassa (GALATI et al., 2001), o que lhe permite crescer em condições adversas, tais como altas temperaturas, solos nutricionalmente pobres e terrenos secos e pedregosos (BARBERA; INGLESE ; PIMIENTA, 1999).

No Brasil a palma foi introduzida, provavelmente, durante o período da colonização, destinada à criação da cochonilha (pequeno inseto, *Dactylopius coccus*, do qual é extraído o corante carmin) com o objetivo de se produzir um corante natural, o carmin, para ser empregado por indústrias têxteis em alguns Estados do Nordeste. Mais tarde, com o lançamento intensivo no mercado de corantes sintéticos derivados do petróleo, o processo de produção do carmin foi inviabilizado, levando ao abandono dessa atividade. Assim, as espécies introduzidas passaram a ser vistas como plantas ornamentais e somente por volta de 1915, é que a palma veio a ser utilizada como forragem, despertando o interesse de criadores que passaram a cultivá-la para este fim (ALBUQUERQUE; SANTOS, 2005).

No Nordeste do Brasil podem ser encontrados três tipos diferentes de palma: a) gigante - da espécie *Opuntia ficus indica*; b) redonda – (*Opuntia* sp); e c) miúda - (*Nopalea*

cochenilifera). São espécies que não toleram umidade excessiva e em solos profundos apresentam extraordinária capacidade de extração de água do solo, a ponto de possuir cerca de 90-93% de umidade, o que torna importantíssima para a região do polígono das secas, que compreendem os Estados: Alagoas, Bahia, Ceará, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe (SILVA; SANTOS, 2006).

2.1.2 Morfologia, fisiologia e composição química

Opuntia ficus indica (Figura 1) pertence ao reino *Plantae*, à divisão Magnoliophyta, à classe Magnoliopsida, à ordem Caryophyllales, à família Cactácea, à subfamília Opuntioideae e o gênero *Opuntia* (ALVES, J., 2011).

É popularmente designada por figueira-da-índia, nopalera, tuna, figueira de mor, indiapico (ALVES et al., 2008), figueira-do-diabo, figueira-do-inferno, palma forrageira, palma (PLANTAMED, 2010), entre outros.

Figura 1. Plantação de *Opuntia ficus indica* em Caruaru – PE.



Fonte: SANTOS, M., 2013

Os espécimes da *Opuntia ficus indica* apresentam plantas de arbustivas a arborescentes com aproximadamente 1,7 m de altura, com um talo primário lignificado, bem definido. O sistema radicular é superficial, com uma raiz principal, que em condições favoráveis de umidade, se concentra em torno de 30 cm de profundidade, enquanto que, em condições de seca desenvolvem ramificações horizontais que se aprofundam para absorver água em níveis mais baixos (ALBUQUERQUE; SANTOS, 2005).

A parte aérea da planta é formada por segmentos denominados de cladódios, vulgarmente conhecido como broto ou verdura, que possui aparência de folhas carnudas, sendo, no entanto, caules modificados que estão articulados uns nos outros. São usualmente elípticos, porém podem ser também obovados, ovulados, circulares, etc. Os espinhos geralmente estão ausentes, porém podem aparecer poucos cladódios com um espinho, geralmente acicular, fundida e branca de 4-7 mm de comprimento (REYES-AGUERO et al., 2005; CHAVES., et. al. 2008). Os brotos jovens possuem cor variando de verde-escuro a verde-claro, que com o passar do tempo, tornam-se esbranquiçados ou acinzentados, devido à lignificação dos mesmos, transformando-se em verdadeiros caules lenhosos (SÁENZ, 2006).

As flores (Figura 2) são de hábito diurno, grandes, com 7-8 cm de diâmetro, podem ser amarelas ou alaranjadas, o pericarpo é 2-2,5 vezes mais comprido do que o perianto, desenvolvendo-se na parte superior dos cladódios com um ou dois anos (REYES-AGUERO et al., 2005; SCHEINVAR, 2001).

Figura 2. Flor da palma forrageira.



Fonte: ANDERSON, 2001

O fruto (Figura 3), designado comumente por figo da índia é doce, carnudo, succulento, de forma ovoide, globosa, cilíndrica e umbilicada no extremo superior. É provido de um pericarpo duro, no qual se encontram pequenos espinhos de celulose. O seu comprimento varia de 4,8-10,0 cm a sua largura de 4-8 cm e o seu peso entre 100 e 200 g. As sementes são

lenticuladas a amplamente elipsoidal, com 188-335 por fruto (ALVES et al., 2008; REYES-AGUERO et al., 2005).

Figura 3. Diversos frutos da palma forrageira



Fonte: ANDERSON, 2001

As diferentes partes da planta *Opuntia ficus indica* possuem variadas propriedades que têm suscitado o interesse por parte dos investigadores e, por isso, têm sido realizados vários estudos com o intuito de conhecer melhor a sua composição química e consequentes propriedades farmacológicas que lhe conferem o seu potencial biológico. Das espécies pertencentes ao gênero *Opuntia*, a planta *Opuntia ficus indica* é uma das mais investigadas (ALVES et al., 2008). Os cladódios são um dos elementos da planta *Opuntia ficus indica* mais utilizados em proveito das suas propriedades benéficas para a saúde humana (PEREZ - CACHO et al., 2006).

Os principais constituintes dos cladódios de *Opuntia ficus indica* são hidratos de carbono complexos (ex: fibras solúveis, celulose, mucilagem) (TROMBETTA et al., 2006). Também apresentam na sua constituição glicoproteínas (SCHAFFER; NANNEY, 1996), compostos aromáticos (particularmente pigmentos como as betacianinas e betaxantinas), polifenóis (em particular alguns flavonoides, tais como quercetina, Caempferol, taxifolina (STINTZING; CARLE, 2005) e proantocianidinas (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003). Possuem, ainda, algumas classes de lípidos (esteróis e ácidos graxos), glutathione, vitaminas (ex: a vitamina C e E), carotenóides (PANICO et al., 2007) e minerais (MALAININE et al., 2003).

A verdura (cladódio) de palma forrageira se compõe principalmente de água (92%) e carboidratos, incluindo fibra (4-6%), alguma proteína (1-2%) e minerais, sobretudo cálcio (1%). Também contêm quantidades moderadas de vitamina C (10-15 mg/100 g) e o precursor

da vitamina A, o β -caroteno (30 $\mu\text{g}/100\text{ g}$ de carotenóides) (FEITOSA-TELES et al., 1984; RODRÍGUEZ-FÉLIX; CANTWELL, 1988). Como os teores de carotenóides e vitamina C estão entre os da alface e do espinafre, a contribuição da verdura de palma forrageira à dieta pode ser significativa, sobretudo em zonas áridas. O perfil de aminoácidos da proteína da verdura de palma forrageira é semelhante ao de outras verduras (FEITOSA-TELES et al., 1984).

O fruto é constituído por água (84,2% expresso em fruto fresco), proteínas (0,99%), hidratos de carbono (0,24%), fibras (3,16%), vitamina C (22,56%). Foram também encontrados ácidos orgânicos como o ácido cítrico e o ácido málico. Normalmente o pH do fruto varia entre os 5,3 e 7,1. (ALVES et al., 2008). Os frutos são também uma fonte importante de fitoquímicos como os flavonóides (isoramnetina -3-O- rutinósido e isoramnetina-3-O-glucósido e derivados de quercetina) e betalaínas (STINTZING; CARLE, 2005; GINESTRA et al., 2009).

Apesar dos estudos efetuados acerca desta planta, não existe muita informação sobre a flor, sabe-se que tem na sua composição derivados de isoramnetina, canferol, luteolina e quercetina. Foram já também isolados β -sitosterol e ácidos graxos (ALIMIA et al., 2011).

2.1.3 Principais usos

Os cactos do género *Opuntia* spp. são usados na medicina tradicional, sendo considerados uma boa fonte de nutrientes de origem vegetal que pode melhorar a nutrição e saúde humana (STINTZING; CARLE, 2005). São usados como fonte de alimento pelos nativos da América há milhares de anos (PÉREZ - CACHO et al., 2006).

A palma forrageira é largamente usada em todo o mundo e vem se mostrando uma planta bastante versátil (Tabela 1). Os principais produtores desta planta são países como a Itália, Israel, Chile, Estados Unidos, México e Colômbia. Destes, o México é o país com maior variabilidade genética desta planta, maior área cultivada e maior consumo de frutos (GARCIA; SILVA, 2005).

No Norte da África, a planta *Opuntia fícus indica* é usada contra a erosão do solo em zonas áridas e como substituto de forragem durante as secas (MALAININE, 2003).

Na Argentina, é famoso o uso do suco baboso dos cladódios da palma forrageira, que tradicionalmente vem sendo usado para que as pinturas brancas à base de cal se tornem mais viscosas e aderentes (SEBRAE/PB, 2001).

No Brasil destaca-se o cultivo para a produção de forragem destinada a bovinos e caprinos (VERAS et al., 2002; COSTA et al., 2009; e MATTOS, 2009), sobretudo na região Nordeste, em especial nos estados da Bahia, Alagoas e Pernambuco, onde estima-se existirem, aproximadamente 500 mil hectares cultivados (SANTOS et al., 2006).

A espécie *Opuntia ficus indica* é, também, conhecida pelas suas propriedades terapêuticas. De acordo com a medicina popular Mexicana, o consumo dos cladódios pode atenuar certas doenças, tais como, distúrbios gastrointestinais, diabetes mellitus, hiperlipidemia e obesidade (GARCIA et al., 2004).

Tabela 1: Usos e aplicações potenciais da palma forrageira.

Utilização	Partes da planta
Alimentação animal: Forragem em pastejo ou cocho.	Cladódios, frutos e sementes.
Alimentação humana: Frutos e cascas dos frutos, suco, polpa, licores, vinhos, doces, geleias, purês, compotas, marmeladas, adoçante líquido, óleo comestível das sementes, saladas, bolos, iogurte, usado com verdura em diversas preparações (cladódios).	Cladódios, frutos e sementes.
Energia: etanol, biogás e lenha.	Cladódios e frutos
Agrícola: Proteção e conservação dos solos, Construção de cercas-vivas ou barreiras, matéria orgânica.	Cladódios
Medicinal: Diarreias (cladódios), Diurético (flores e raízes), Disenteria amebiana (flores), Hiperlipidemia (cladódios), Obesidade (fibras), Antiinflamatório (cladódio), Cicatrizante (cladódios), Diabetes mellitus (cladódios), Cataplasmas na pele irritada ou ferida, Para melhorar a função renal (flores).	Cladódios, flores, raízes.
Cosmética: Xampu, Creme umectante, Sabonetes, Adstringente, Loções para o corpo.	Cladódios
Outros: Planta ornamental, adesivos, cola, pectinas, fibras, papel, antitranspirante, corante, mucilagem, Trabalhos de oferendas, homenagear divindades (cultura Santería), amuletos contra “mau olhado”, fonte de água, corantes (frutos), controle de pragas como cupins (lectina dos cladódios), Usado tradicionalmente para que as pinturas brancas à base de cal se tornem mais pegajosas e aderentes.	Cladódios, frutos

Adaptado de Barbera (2001 apud SANTOS, M., 2013)

Os cladódios de *Opuntia ficus indica* são utilizados em casos de blefarites, conjuntivites, psoríase, eczemas, edema, dores musculares, afecções cutâneas e no controle da diabetes (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003) e para usufruir da sua atividade cicatrizante, antiulcerosa e anti-inflamatória (GALATI et al., 2001), nas inflamações dos aparelhos respiratório (em situações de tosse irritativa sob a forma de xarope) e digestivo (ex. síndrome do cólon irritável). Além disso, são utilizados no combate à fadiga, na diminuição da pressão

arterial e dos níveis séricos de colesterol e para atuar nas dores reumáticas, nos problemas de fígado e na fragilidade capilar (AGOZZINO et al., 2005).

No que diz respeito ao uso externo dos cladódios da planta *Opuntia ficus indica* estes são habitualmente utilizados em cataplasmas, sendo aplicados a quente diretamente na pele irritada ou ferida, tendo cuidado para não queimar (CUNHA; SILVA; ROQUE, 2003; CHAVES, 2008).

A grande diversidade de usos e aplicações da palma forrageira revela a versatilidade dessa espécie vegetal, que apesar de ser cultivada no semiárido paraibano para alimentação animal, não tem sua potencialidade explorada plenamente. Em consequência, vêm sendo desperdiçadas excelentes oportunidades para melhoria dos índices sociais e econômicos desse espaço geográfico, mediante a geração de postos de trabalho, renda, oferta de alimentos e preservação ambiental (CHIACCHIO; MESQUITA; SANTOS, 2006).

A ampla faixa de possibilidades de obtenção de produtos e subprodutos da palma forrageira cria novas oportunidades para as regiões semiáridas. Não obstante, muitos aspectos relacionados ao processamento da palma forrageira devem ser pesquisados mais profundamente. Sob esse aspecto, trata-se de uma cultura velha e nova ao mesmo tempo, com muitas possibilidades de contribuir para a alimentação humana, medicina e outros campos, principalmente no caso dos habitantes de baixa renda em várias partes do mundo (SEBRAE/PB, 2001).

2.1.4 Palma forrageira na alimentação humana

Desde o período pré-hispânico que a palma forrageira é utilizada pelo homem no México, juntamente com o milho e a agave, consideradas as espécies vegetais mais antigas cultivadas no território mexicano (REINOLDS; ARIAS, 2004). No México existe o consumo intensivo de brotos da palma por diversas famílias, o que caracteriza um hábito alimentar dessa população. Na América Latina são frequentemente consumidos, como preparações culinárias, os brotos da palma ou cladódios, denominados de verduras e o fruto da palma, *in natura* ou processado (REINOLDS; ARIAS, 2001). Já no mercado Europeu e Norte-Americano somente os frutos frescos são mais difundidos (FEUGANG et al., 2006). No mundo, o uso de broto palma ou verdura, basicamente, é restrito ao México e outros países com influência mexicana (FLORES VALDEZ, 2001), onde existem mais de 200 receitas de comidas à base de palma forrageira (GUEDES et al., 2004).

Nos EUA e alguns países europeus e asiáticos, a verdura participa de receitas culinárias, consumidas esporadicamente como alimento exótico. No Brasil, especificamente em alguns municípios do Sertão baiano e da Chapada Diamantina, o broto de palma entra na dieta alimentar da população, a ponto do broto estar sendo empacotado e comercializado nas feiras livres (GUEDES, 2002) e várias receitas de pratos com sabores regionais vêm sendo desenvolvidas por Guedes (2002) e Guedes et al.(2004).

Os cladódios são normalmente consumidos como verdura fresca ou cozidos, logo após a retirada dos espinhos. Nas preparações cruas, são previamente colocados em água com vinagre, enquanto que nas cozidas são fervidos nesta mesma solução e depois escorridos. Em ambos os casos, o tratamento é feito com a finalidade de reduzir a secreção viscosa. Os brotos, cujo sabor lembra o feijão verde, são cortados, picados, cozidos ou grelhados, e consumidos como salada ou como parte de uma refeição (GUEDES et al., 2004).

Os brotos também são consumidos como produtos industrializados. No Sul dos Estados Unidos e no México, os principais produtos associados aos brotos são preparados em salmoura ou em conserva, na forma de molhos, patê, compotas, doces, bebidas e farinha. O broto em salmoura ou pickles é o mais consumido, sendo, portanto o mais processado (CORRALES-GARCÍA; SÁENZ, 2006).

A agroindustrialização da palma forrageira resulta em diversas preparações, produtos e derivados, permitindo o uso diversificado das raquetes jovens e dos frutos, fato que resulta em agregação de valor à produção, com efeitos positivos na geração de postos de trabalho e renda. A planta pode ser usada para fazer sucos, saladas, pratos guisados, cozidos e doces (CHIAICCHIO; MESQUITA; SANTOS, 2006). O preconceito é o maior obstáculo na adesão deste alimento, pois tradicionalmente a palma é utilizada como ração animal. Em muitos países como o México, Estados Unidos e Japão a palma é considerada um alimento nobre, servida em restaurantes e hotéis de luxo (CANTWELL, 2001).

No Brasil, algumas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de aproveitar a palma na elaboração de produtos diferenciados para alimentação humana, como também para acabar com o preconceito entre potenciais consumidores de palma, que poderiam ajudar na difusão de uma culinária delicada e nutritiva, que está presente nos mais finos restaurantes de países como o México, a Itália e a Espanha (CHIAICCHIO; MESQUITA; SANTOS, 2006).

Segundo Cantwell (2001) a palma é uma alternativa eficaz para combater a fome e a desnutrição no semiárido brasileiro além de ser uma importante aliada nos tratamentos de saúde. É uma cultura rica em vitaminas A, complexo B e C e minerais como Cálcio, Magnésio, Sódio, Potássio além de 17 tipos de aminoácidos. A palma é mais nutritiva que

alimentos como a couve, a beterraba e a banana, com a vantagem de ser um produto mais econômico (NUNES, 2011).

Estudos conduzidos por Batista et al. (2010) revelaram que a mistura de goiaba e palma (*Opuntia ficus indica*) na elaboração de bebidas mistas pode ser utilizada como um recurso para agregar ao produto novas características organolépticas e nutricionais. Seus resultados mostraram que a palma promoveu um incremento de ácido ascórbico na bebida. Os autores também avaliaram as características sensoriais do produto, mostrando que o grau de aceitação e de intenção de compra de todas as formulações foi bem aceito pelos provadores.

Gusmão (2011) relatou em suas pesquisas que os brotos de palma (*Opuntia ficus indica*) podem ser usados no processo de obtenção de farinhas, visando enriquecer os alimentos pobres em fibras e em minerais ou substituir parcialmente a farinha de trigo nos produtos de panificação, nos alimentos infantis ou dietéticos.

2.2 Plantas medicinais

Desde as antigas civilizações as plantas desempenham um papel crucial para humanidade (MICHILES; BOTSARIS, 2005). As primeiras farmacopéias e formulários de produtos surgiram no Egito, destacando-se entre elas o *Papiro Ebers*, que continha centenas de fórmulas e remédios populares à base de plantas para cuidados de saúde, higiene e beleza (DE POLO, 1998).

A busca por alívio e cura de doenças pela ingestão de ervas, talvez, tenha sido uma das primeiras formas de utilização dos produtos naturais (VEIGA-JUNIOR et al., 2005). Para utilizarem as plantas como medicamentos, os povos antigos usavam de suas próprias experiências e da observação do uso das plantas pelos animais (OLIVEIRA et al., 2006). Diversas plantas foram utilizadas pelos indígenas como remédio para suas doenças e como veneno em suas guerras e caças (CARVALHO, 2004). A natureza foi a primeira farmácia a que o recorreu.

Após a II Guerra Mundial, as pesquisas com ervas medicinais foram deixadas de lado pelo grande avanço das formas sintéticas, sendo anos após retomadas (FRANCESCHINI FILHO, 2004). Para Sousa et al. (2011), nos últimos anos vem ocorrendo um retorno ao uso de plantas e medicamentos a partir destas, em um mercado que havia sido dominado por produtos de base sintética. Como resultado, o uso de plantas medicinais, se encontra em expansão em todo o mundo e constitui um mercado bastante promissor, movimentando mundialmente cerca de US\$ 22 bilhões por ano (Nascimento et al., 2005).

Na Terra existem aproximadamente entre 350.000 e 550.000 espécies de plantas e a grande parte delas, apesar de toda a pesquisa e investigação realizada até o momento, ainda não tem estudos químicos, analíticos e/ou farmacológicos (FOGLIO et al., 2006). Neste sentido, o Brasil apresenta enorme biodiversidade, possuindo uma das mais ricas floras do mundo. Entretanto, a biodiversidade brasileira não é totalmente estudada e assim milhões de espécies distintas de vegetais, micro-organismos ou animais podem ser pesquisados (GUERRA; NODARI, 2001).

Segundo Forzza et al. (2013) o Brasil possui aproximadamente 35 mil espécies de vegetais, distribuídas nos diferentes tipos de biomas: Floresta Amazônica, Cerrado, Mata Atlântica, Pantanal, Caatinga e Manguezal (ALBERNAZ et al., 2010; VIEIRA et al., 2010), porém apenas 17% delas são exploradas para pesquisas de compostos biologicamente ativos (POLITI; PIETRO; MOREIRA, 2009; RODRIGUES et al., 2013).

Essa grande biodiversidade da flora brasileira com potencial terapêutico leva a um significativo consumo de fitoterápicos e preparações extraídas de plantas que através do conhecimento tradicional e tecnológico podem ser validadas cientificamente. Este imenso patrimônio genético encontrado no Brasil tem, na atualidade, um valor econômico-estratégico inestimável em várias atividades (BRASIL, 2006), mas é no campo do desenvolvimento de novos medicamentos onde reside sua maior potencialidade, uma vez que existem inúmeros medicamentos obtidos direta ou indiretamente a partir de produtos naturais.

Segundo Oliveira et al. (2006), os fitoterápicos são também uma oportunidade de obtenção de medicamentos mais barato em países em desenvolvimento, onde a maior parte da população não tem acesso à medicamentos sintéticos por seu alto custo. Muitas vezes esses medicamentos são rotulados e aparecem na mídia com promessa de cura (VEIGA JÚNIOR et al., 2005), o que não está correto, pois primeiro são necessários estudos botânicos, farmacológicos, toxicológicos que comprovem a eficácia de determinada substância, para sua comercialização.

Em 1975 o Conselho Nacional de Saúde já valorizava a importância da medicina popular: *“A denominada “medicina popular” é constituída por práticas paralelas à “medicina oficial” dominante. Quem faz esta distinção é o sistema oficial de saúde, constatando sua existência e crescimento, a despeito de todo o avanço científico e tecnológico atual que tem o respaldo do saber científico e do sistema de produção (V CNS, 1975)”*. Desta forma, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância da fitoterapia, sugerindo ser

uma alternativa viável e importante também às populações dos países em desenvolvimento, devido ao seu custo diminuído (SANTOS; NUNES; MARTINS, 2012).

Através do Decreto Presidencial Nº. 5.813, de 22 de junho de 2006, o Governo Federal aprovou a Política Nacional de Plantas Medicinais, onde as ações decorrentes desta política são manifestadas no Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicas – PNPMF e uma de suas propostas é inserir plantas medicinais, fitoterápicos e serviços relacionados à fitoterapia no SUS, com segurança, eficácia e qualidade, em conformidade com as diretrizes da Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares no SUS. (BRASIL, 2006). E, para estimular o desenvolvimento e o consumo dos fitoterápicos, este decreto estimula o cultivo, a formação técnico científica, a formação e capacitação de recursos humanos para o desenvolvimento de pesquisas, tecnologias e inovações em plantas medicinais e fitoterápicos (KLEIN et al., 2009; SOARES; MENDONÇA, 2010).

2.3 Antimicrobianos

O termo antibacteriano é designando para toda substância oriunda de seres vivos, micro-organismos ou vegetais, como também aquelas sintetizadas em laboratório com a capacidade de em pequenas concentrações apresentarem atividade letal ou inibitória contra espécies de bactérias e prevenir o desenvolvimento de micro-organismos resistentes (COSTA, L., 2007).

De acordo com Guimarães, Momesso e Pupo (2010) os antimicrobianos podem ser naturais ou sintéticos e podem agir tanto inibindo o crescimento, sendo chamado de bacteriostático ou, causando a morte da bactéria, sendo classificado como bactericida. Um agente antimicrobiano ideal exibe toxicidade seletiva, e isto implica que uma substância deve ser eficiente contra a bactéria alvo, porém seguro quanto à toxicidade ao paciente (BROOKS et al., 2008; SOFIATI, 2009).

Nos últimos séculos, a resistência microbiana frente aos antibacterianos vem tornando-se um sério risco à saúde coletiva, dificultando e impondo diversas barreiras ao controle de micro-organismos patogênicos de interesse médico-sanitário (DANTAS et al., 2010). Agentes antimicrobianos vêm sendo utilizados desde o século XVII para o tratamento de doenças infecciosas. Os antibióticos são produtos metabólicos naturais de fungos, actinobactérias e bactérias capazes de impedirem o crescimento, ou de destruírem micro-organismos (BLACK, 2002; MADIGAN et al., 2010).

Desde a origem dos antibióticos na década de 1950, o número de agentes antimicrobianos derivados de plantas tem sido insuficiente. A utilização de extratos vegetais, bem como outras formas alternativas de tratamento médico, vem demonstrando grande popularidade desde a década de 1990. Bactérias multirresistentes são um emergente e conhecido problema mundial de saúde (VONBERG et al., 2008). As indústrias se concentram em programas de triagem a fim de identificar novos princípios ativos a partir de fontes naturais (KUMAR et al., 2010).

A busca por novos agentes antimicrobianos a partir de plantas superiores tem sido de grande interesse nas últimas décadas. O “Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI)”, métodos para a avaliação de compostos antimicrobianos, são amplamente aceitos pelos órgãos reguladores em todo o mundo (DAS; TIWARI; SHRIVASTAVA, 2010).

O uso de plantas pode representar uma alternativa de substituição aos antissépticos e desinfetantes sintéticos convencionais, visando evitar o desenvolvimento de resistência bacteriana a estes compostos, uma vez que metabólitos vegetais atuam por mecanismos variados (BARBOUR et al., 2004; MONTHANA; LINDEQUIST, 2005).

Há vários relatos na literatura sobre a atividade antimicrobiana para inúmeros extratos a partir de fontes vegetais em diferentes regiões do mundo (RAVISHANKAR et al., 2012; CARLOS et al., 2010; PARK et al., 2009; CAILI; HUAN; QUANHONG, 2006). Recentemente vários estudos foram realizados para identificar novos e potentes compostos antimicrobianos isolados de plantas, os chamados "Antibióticos naturais", porque estes possuem o potencial de ultrapassarem a resistência antimicrobiana (RAVISHANKAR et al., 2012; PARK et al., 2009).

Substâncias antimicrobianas de origem natural são normalmente identificadas em diferentes partes dos vegetais, tais como folhas, caules, sementes, frutas e raízes. Mais de 1300 espécies oriundas de fontes vegetais são relatadas na literatura com a capacidade de apresentar atividade antimicrobiana a partir de compostos químicos presentes em sua composição, sendo que muitos deles já foram isolados e são usados em muitas áreas, incluindo na indústria de alimentos (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010; BURT, 2004).

As plantas possuem várias vias metabólicas secundárias que dão origem a compostos como alcaloides, flavonoides, isoflavonoides, taninos, cumarinas, glicosídeos cardiotônicos, terpenos que por vezes, são específicos de determinadas famílias, gêneros ou espécies, e cujas funções, até pouco tempo, eram desconhecidas (SIMÕES et al. 2004). As plantas com maior atividade antimicrobiana são aquelas ricas em polifenóis, flavonóides e taninos (DOUGHARI;

EL-MAHMOOD; TYOUNA, 2008), terpenóides, alcalóides, lectinas, polipeptídeos, e cumarinas (RESCHKE; MARQUES; MAYWORM, 2007; HAIDA et al., 2007).

De acordo com González-Lamothe et. al. (2009), os produtos do metabolismo secundário acumulado pelas plantas podem atuar de duas formas: como “potencializadores de atividade antibacteriana”, favorecendo a atividade de antibióticos cuja ação encontra-se limitada por mecanismos de multirresistência desenvolvidos pelos micro-organismos; ou como “atenuantes de virulência”, adequando a resposta do sistema imune do hospedeiro à infecção.

O grande aumento em infecções hospitalares, causada por bactérias resistentes ou multirresistentes é um dos maiores problemas de saúde pública (FONTANAY et al., 2008). Especialmente na última década, o grau de resistência aos antibióticos comuns é cada vez mais crescente em todo o mundo (TANG et al., 2011). Incluindo o Brasil, principalmente em unidades de tratamento intensivo (UTIs) (PUEYOA et al., 2011).

Bactérias patogênicas como *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* despontam-se como contaminantes comuns na indústria de cosméticos e instalações hospitalares. Tais micro-organismos apresentam cepas resistentes aos antimicrobianos usuais, tornando a sua ocorrência uma ameaça potencial à saúde (DANTAS et al., 2010).

De acordo com Furtado et al. (2008), uma das principais causas de resistência antimicrobiana é a grande exposição aos fármacos antimicrobianos, dentre outros, através da prática da automedicação. Os fatores que contribuem para a ocorrência e persistência da resistência bacteriana são: o uso indiscriminado e prolongado de antimicrobianos químicos sintéticos (CRISAN et al., 1995), a utilização de antibióticos para o tratamento e prevenção de infecções em animais e no controle de infecção bacteriana em frutas e legumes que aumentam a transmissão de organismos multirresistentes para seres humanos (COHEN, 1992; HOEFEL et al., 2006).

O problema da resistência microbiana é crescente e a perspectiva de uso de drogas antimicrobianas no futuro é incerta. Portanto, devem ser tomadas atitudes que possam reduzir este problema como, por exemplo, controlar o uso de antibióticos e, desenvolver pesquisas para melhor compreensão dos mecanismos genéticos de resistência e continuar o estudo de desenvolvimento de novas drogas, tanto sintéticas como naturais (NASCIMENTO et al., 2000; HAIDA et al., 2007).

Através da Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) Nº 44, de 26 de outubro de 2010 a Agência Nacional de Vigilância Sanitária ratifica e estabelece os critérios, de forma mais rigorosas, para a embalagem, rotulagem, liberação e controle de medicamentos à base de

substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição, isolado ou em associação. A liberação destes medicamentos contendo as substâncias antimicrobianas fica sujeita à retenção de receita e escrituração em farmácias e drogarias, nos termos desta resolução (BRASIL, 2010).

Atualmente, existem vários testes para análise de sensibilidade antimicrobiana, desde métodos convencionais a metodologias mais modernas. Entre os mais utilizados pode-se citar os métodos de difusão em ágar, microdiluição em caldo, entre outros. Entretanto, a análise da concentração inibitória mínima (CIM), isto é, microdiluição seriada em caldo, tem sido uma das metodologias mais aplicada, uma vez que este teste, além de avaliar a atividade antimicrobiana, possibilita a determinação da mínima concentração necessária para inibir o crescimento dos micro-organismos (NCCLS, 2003).

A determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) pelo método da microdiluição é um ensaio quantitativo *in vitro* aplicado para avaliar a atividade antibacteriana. Uma das vantagens deste método é a avaliação do comportamento de diferentes micro-organismos frente a concentrações crescentes dos compostos analisados. A menor concentração capaz de inibir o crescimento das bactérias é denominada de CIM. O crescimento antibacteriano e a CIM são observados visualmente nas placas, sendo que as culturas que apresentam crescimento são usadas para inocular placas com meio sólido, de forma a determinar a Concentração Bactericida Mínima (CBM) (NCCLS, 2003).

2.4 Antioxidantes

Os compostos antioxidantes podem ser definidos como substâncias que, quando presentes em pequenas concentrações em relação ao substrato oxidável, são capazes de retardar ou mesmo inibir substancialmente a oxidação do substrato (NIKI, 2010). Naturalmente, alguns antioxidantes são produzidos pelo corpo humano e outros podem ser adquiridos pelo consumo de alimentos (ARAÚJO, 2004).

Os antioxidantes podem ser divididos em dois grupos: aqueles que apresentam atividade enzimática, bloqueando o início da oxidação com remoção de espécies reativas ao oxigênio por meio de enzimas, e aqueles que não apresentam atividade enzimática, neste caso, encontram-se moléculas capazes de interagir com radicais durante a reação, como é o caso dos carotenóides, vitaminas e compostos fenólicos (MOREIRA; MANCINI-FILHO, 2004).

Dentre os antioxidantes naturais, destacam-se as vitaminas C e E, os carotenoides e os compostos fenólicos, especialmente os flavonoides, que são os antioxidantes mais abundantes

na alimentação humana. Esses antioxidantes absorvem radicais livres e inibem a cadeia de iniciação ou interrompem a cadeia de propagação das reações oxidativas promovidas pelos radicais (PODSEDEK, 2007).

Os radicais livres (RL) podem ser caracterizados como moléculas orgânicas e inorgânicas, que possuem átomos contendo um ou mais elétrons desemparelhados, ou seja, elétrons isolados ocupando um orbital atômico ou molecular (HALLIWELL, 2011; BERNARDES; PESSANHA; OLIVEIRA, 2010). Essa configuração faz dos radicais livres, moléculas altamente instáveis, com meia-vida curtíssima e quimicamente muito reativas (BERNARDES; PESSANHA; OLIVEIRA, 2010).

O efeito cumulativo desses radicais provocam vários danos no organismo, como por exemplo, o declínio funcional de células e tecidos (CLANCY; BIRDSALL, 2013). Os danos oxidativos são responsáveis por alterações tão alarmantes, que as espécies reativas de oxigênio (EROs) (Tabela 2) que são geradas nos tecidos, podem chegar a provocar a morte celular. Esses danos têm sido relacionados ainda com várias patologias, incluindo doenças degenerativas, tais como as cardiopatias, aterosclerose e problemas pulmonares. Os danos no DNA causados pelos radicais livres, também, desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese (BERNARDES; PESSANHA; OLIVEIRA, 2010; MARIOD, et al., 2010).

Tabela 2. Espécies reativas de oxigênio (EROs)

EROS	Nomeclatura
O_2^-	Radical superóxido
OH^-	Radical hidroxila
NO	Óxido nítrico
$ONOO^-$	Peroxinitrito
Q	Radical semiquinona
O_2	Oxigênio singlete

Fonte: Moreira, V., 2013 – modificado

O aumento do nível de EROs pode danificar a estrutura das biomoléculas e modificar suas funções; levar à disfunção celular e até mesmo a morte celular. Para tanto, os antioxidantes são substâncias químicas que protegem um alvo biológico contra o dano oxidativo além de neutralizarem os efeitos nocivos dos radicais livres e EROs (HALLIWELL, 2011; ALI et al., 2008). Quando presentes em concentrações ideais em relação aos substratos,

os antioxidantes são capazes de proteger o organismo humano contra inúmeras doenças (BERNARDES; PESSANHA; OLIVEIRA, 2010).

Existem duas categorias de compostos antioxidantes, os de origem natural e os designados sintéticos (CHEUNG; CHEUNG; OOI, 2003). Os antioxidantes naturais dividem-se em dois grandes grupos, os enzimáticos e os não enzimáticos. Os antioxidantes enzimáticos incluem as principais enzimas antioxidantes, como a superóxido dismutase, catalase e glutathione peroxidase. Alguns exemplos de antioxidantes não enzimáticos incluem a vitamina C, compostos fenólicos hidrossolúveis e compostos lipossolúveis (vitamina E e carotenoides) (NDHLALA; MOYO; VAN STADEN., 2010).

A nossa rica flora e fauna levou a formação de seres vivos capazes de produzir variadas moléculas com ação antioxidante, e essas substâncias naturais podem ser uma importante estratégia para o combate de várias enfermidades (MISHRA; OJHA; CHAUDHURY, 2012). Extratos brutos derivados de plantas ganham, cada vez mais, interesse por parte dos pesquisadores, devido à sua ação em retardar a degradação oxidativa e assim melhorar a qualidade e valor nutritivo dos alimentos (LIU et al., 2011). A ingestão dietética de antioxidantes naturais presentes na maioria das fontes vegetais pode agir como potentes agentes preventivos de alterações relacionadas ao estresse oxidativo (RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009).

Os compostos fenólicos têm recebido atenção nos últimos anos por sua ação antioxidante, inibindo a peroxidação lipídica e a lipoxigenase *in vitro*. Estes compostos desempenham um papel importante, agindo tanto na etapa de iniciação como na propagação do processo oxidativo (SOUSA et al., 2007).

Dentro dos compostos fenólicos, os flavonóides são também muito conhecidos devido ao seu grande poder antioxidante conferindo estabilidade oxidativa aos produtos onde se encontram presentes. São compostos benéficos em determinadas doenças, como é o caso de doenças cardiovasculares, algumas formas de cancro, doenças neurodegenerativas, diabetes e osteoporose (REPO-CARRASCO-VALENCIA et al., 2010; MOUSSA-AYOUB et al., 2011).

As propriedades antioxidantes destes compostos foram o primeiro mecanismo de ação a ser estudado, nomeadamente no que respeita ao seu poder protetor contra doenças cardiovasculares. Os flavonóides têm mostrado ser altamente eficazes contra a maioria das moléculas oxidantes, incluindo o oxigênio e os vários tipos de radicais livres que estão possivelmente envolvidos nos danos do DNA e promoção de tumores (MOUSSA-AYOUB et al., 2011).

A atividade dos antioxidantes é de extrema importância, uma vez que o seu papel na preservação da saúde humana, na prevenção e no tratamento de doenças tem sido evidenciado. Vários métodos foram desenvolvidos para avaliar a eficácia antioxidante. As suas vantagens e desvantagens têm sido discutidas em termos de simplicidade, instrumentação necessária, mecanismos, método de quantificação e relevância biológica (NIKI, 2010).

2.5 Toxicidade

Toxicidade é a propriedade potencial de uma determinada substância química de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução ou interação com o organismo. Esta propriedade é verificada através da avaliação toxicológica onde se obtêm dados como dosagem, sinais, efeitos provocados que irão determinar o potencial de toxicidade. Os estudos toxicológicos têm a finalidade de avaliar a ideia errônea de que produtos fitoterápicos, por serem naturais, são isentos de efeitos tóxicos ou adversos, e que somente o uso popular de plantas medicinais não serve como validação da eficácia destes medicamentos (LORA, 2007).

A ocorrência natural nos vegetais de compostos como alcalóides pirrolizidínicos, ácido aristolóquico, ésteres de forbol, a ocorrência de contaminação por micro-organismos, metais pesados, aflatoxinas além da identificação vegetal incorreta são alguns dos fatores responsáveis por casos de toxicidade relacionada com o uso de plantas medicinais (FARNSWORTH, 1993).

No Brasil, no ano de 2010, registrou-se 1.377 casos de intoxicações humanas por plantas medicinais, representando 1,33% em relação aos demais possíveis agentes tóxicos, sendo o uso indevido o maior responsável pelos números de casos identificáveis. Desta totalidade, a região Sul é a segunda do país com maior índice das intoxicações, com 330 casos, e Porto Alegre a cidade com a maior representatividade, com 300 casos registrados (90,9%), confirmando o desconhecimento e falta de informação da população a cerca dos riscos em torno destes produtos (GONÇALVES, 2014).

Para o desenvolvimento de novas drogas, a atividade de um composto precisa ser comparada em vários sistemas de testes, utilizando outros já conhecidos (padrão). Os testes escolhidos devem ser simples e rápidos e também, na medida do possível, específicos para o tipo de atividade biológica a investigar (RANG; DALE; RITTER, 2001).

Portanto, a seguir é feita uma revisão acerca de dois bioensaios utilizados na determinação da atividade biológica de extratos, frações e compostos extraídos de vegetais: o bioensaio simples de letalidade da *Artemia salina* e toxicidade aguda.

2.5.1 Ensaio com *Artemia salina* Leach

O uso de invertebrados como bioindicadores ou bioacumuladores é utilizado em testes antes do uso de vertebrados e envolve, dentre os resultados primários, a avaliação da toxicidade e genotoxicidade dos compostos testados (KANWAR, 2007).

A letalidade de organismos simples tem sido utilizada para um rápido e relativamente simples monitoramento da resposta biológica, onde existe apenas um parâmetro envolvido: morte ou vida. Os resultados podem ser facilmente tratados estatisticamente. Estudos relatam que a *Artemia salina* Leach (Artemiidae) é utilizado para determinar toxicidade de produtos naturais e químicos, considerando que estas larvas apresentam sensibilidade a substâncias tóxicas. Além disso, tem a vantagem de ser um teste rápido e barato. (CAVALCANTE et. al., 2000; SANTOS PIMENTA et. al., 2003) Dentre os ensaios mais citados estão os de *Artemia salina* Leach, que permite avaliar a toxicidade geral, sendo considerado um bioensaio preliminar no estudo de extratos e metabólitos especiais com potencial atividade biológica (MACIEL et al., 2002).

Artemia salina, comumente conhecida como o “camarão de água salgada”, é um microcrustáceo sem carapaça, da classe Anostracea, e uma apreciável fonte de alimento para peixes e outros crustáceos, tanto em ecossistemas marinhos quanto em aquários marinhos. Fotossensível, como outros organismos aquáticos primitivos, essa larva apresenta sensibilidade a substâncias tóxicas, sendo considerada um indicador de toxicidade. Alguns estudos correlacionam o ensaio de toxicidade com larvas de *Artemia salina* com atividades fungicida, viruscida, bactericida e parasiticida, o que mostra o amplo campo de efetividade da técnica (SOUZA 2011).

Por esse método, é possível determinar a concentração letal (CL₅₀) de componentes ativos e extratos em um meio salino. A atividade do teste é manifestada pela toxicidade de componentes ativos, frações ou extrato de produtos naturais frente ao organismo marinho *A. salina*. O estágio de larvas mais usado em testes laboratoriais compreende o período de vida de 24 a 48 h depois da eclosão (KANWAR, 2007).

A atividade biológica é registrada considerando a concentração quando 50% das larvas estão mortas no prazo de 24 horas em contato com o extrato: CL₅₀ abaixo 249 µg /mL são considerados como altamente tóxico, 250-499 µg /mL como toxicidade mediana e 500-1000 µg /ml como toxicidade baixa. Valores acima de 1000 µg /mL são considerados como não tóxico (BUSSMANN et al., 2011).

2.5.2 Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade oral aguda é descrito pelo Guideline 423 (OECD 423; 2001) e tem como objetivo produzir efeitos adversos em um breve período após a administração oral de uma única dose de uma substância ou após múltiplas doses fornecidas durante 24 horas. Desta forma, pode fornecer subsídios referentes aos riscos à saúde após uma exposição de curta duração (DIPASQUALE; HAYES, 2001).

A avaliação de toxicidade aguda também tem por objetivo caracterizar a relação dose/resposta que conduz ao cálculo da DL₅₀ (dose letal mediana), sendo que além da letalidade, outros parâmetros devem ser investigados, tais como o potencial tóxico em órgãos específicos, os indicativos sobre a toxicocinética e mecanismos de ação e o estabelecimento das doses para estudos complementares de toxicidade (VALADARES, 2006). É no ensaio agudo que se avalia o *screening hipocrático*, o qual fornece uma estimativa geral da toxicidade da substância sobre o estado consciente e disposição geral, atividade e coordenação do sistema motor, reflexos e atividades sobre o sistema nervoso central e sobre o sistema nervoso autônomo, onde o parâmetro mortalidade poderá ser observado a partir do estado moribundo do animal em 24 h, e nos 14 dias consecutivos (QUEIROZ et al., 2013).

A base da técnica consiste em se administrar em grupos de três animais, doses sequenciais de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg. A sequencia das doses só é obedecida caso se observar a morte de mais de 1 animal com a dose escolhida.. A administração da dose de 5000 mg/kg só é recomendada quando extremamente necessário. Isto possibilita a estimativa de uma faixa de DL₅₀ conforme os padrões da *Globally Harmonised System* (GHS), propiciando a classificação por classe toxicológica da substância administrada (Tabela 3). Uma das três ações é requerida: parar no teste que atribui à classificação do risco apropriado; testar uma dose fixa maior ou uma dose fixa menor. Dependendo da mortalidade ou do estado moribundo dos animais, outras doses intermediárias podem ser necessárias para que se admita um critério da toxicidade aguda na sustância–teste (OECD, 2001).

Tabela 3. Classificação de risco toxicológico agudo segundo o GHS (*Globally Harmonised System*).

Classe toxicológica	Dose Letal mediana (DL ₅₀)
I	(> 0 - 5 mg/Kg)
II	(> 5 - 50 mg/Kg)
III	(> 50 - 300 mg/Kg)
IV	(> 300 - 2000 mg/Kg)
V	(> - 2000 mg/Kg)

FONTE: OECD, 2001.

A dose inicial selecionada é aquela mais propensa a produzir mortalidade com base em relatos de dose com toxicidade evidente, quando possível, ou através de relatos evidenciados com base na estrutura química. Quando se trata de um extrato de planta já utilizado pelas populações, pode decidir-se iniciar a triagem com a dose de 2000mg/Kg (Figura 4). Faz-se a administração a três ratos da dose de 2000 mg/kg, preferencialmente pela manhã. A ocorrência da morte de 0-1 animal induz a repetição da mesma dose administrada em outros três animais. Obtendo a morte de até um animal a amostra não é considerada tóxica ou entra na Classe 5, cuja faixa de DL₅₀ varia até 5000 mg/kg sendo maior que 2000 mg/kg (DL₅₀ > 2000 mg/Kg). No entanto, caso ocorra a morte de 2 ou 3 animais, isto implicaria na administração de uma dose seqüencial inferior, correspondente a 300 mg/kg. Se morresse mais de um animal, administraria doses seqüenciais menores até possibilitar estimativa de uma faixa de DL₅₀, conforme os padrões da *Globally Harmonised System* (GHS) (OECD, 2001).

O diagnóstico de doenças hepáticas pode ser constituído pela determinação da bilirrubina sérica, albumina e das enzimas transaminases: aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), entre outras (GAYOTTO; ALVES, 2001). A dosagem de glicose sérica, colesterol e triglicerídios contribuem também para avaliar o dano hepatocelular. De acordo com Necchi (2011), os parâmetros bioquímicos para toxicidade renal são: as dosagens séricas de creatinina, ureia e depuração de creatinina. A concentração de creatinina sérica é uma excelente medida para avaliar a função renal. Os teores de creatinina sérica são mais sensíveis e específicos que a medida da concentração plasmática da uréia (MOTTA, 2003).

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Investigar a atividade antimicrobiana, antioxidante e verificar possíveis efeitos tóxicos da mucilagem de palma forrageira (*Opuntia ficus indica*).

3.2. Específicos

- Coletar os cladódios da palma forrageira e preparar a mucilagem;
- Dosagem de polifenóis e flavonoides;
- Determinar a atividade antimicrobiana da mucilagem de palma forrageira;
- Determinar a atividade antioxidante da mucilagem de palma forrageira;
- Realizar ensaio de toxicidade letal da *Opuntia ficus indica* usando *Artemia salina*;
- Realizar a toxicidade aguda (dose única, 14 dias) da mucilagem em ratos da linhagem Wistar.
- Avaliar por meio de exames bioquímicos e hematológicos, a presença de possíveis lesões no fígado e rins, produzidas pela toxicidade aguda, após administração oral da mucilagem de *O. ficus indica*.
- Verificar variação no peso corporal em diversos momentos ao longo do experimento e peso dos órgãos ao final dos testes.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AL-BAKRI, A.G., AFIFI, F.U. (2007) Evaluation of antimicrobial activity of selected plant extracts by rapid XTT colorimetry and bacterial enumeration. **Journal of Microbiological**, v. 68, p. 19-25, 2007.
- ALBERNAZ, L.C.; DE PAULA, J.E.; ROMERO, G.A.S.; SILVA, M.R.R.; GRELLIER, P.; MAMBU, L.; ESPINDOLA, L.S. Investigation of plants extracts in tradicional medicine of the Brazilian Cerrado against protozoans and yeasts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 131, n. 1, p. 116-121, 2010.
- ALBUQUERQUE, S. G.; SANTOS, D. C. Palma Forrageira. In: KILL, L. H. P.; MENEZES, E. A. (Ed.). **Espécies vegetais exóticas com potencialidades para o semiárido brasileiro**. Petrolina, PE: Embrapa Semiárido, 2005. p. 91-127.
- AGOZZINO, P.; AVELLONE, G.; CERAULO, L.; FERRUGIA, M.; FILIZZOLA, F. Volatile profile of sicilian prickly pear (*Opuntia ficus-indica*) by SPME-GC/MS analysis. **Italian Journal of Food Science**, v. 17, n. 3, p.341-348, 2005.
- ALI, S.S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. **Food Research International**, v. 41, n.1, p. 1-15, 2008.
- ALIMIA, H; HFAIEDHC, N; ZOUHOUR, BOUONIA Z; SAKLYB, M. Evaluation of antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. inermis flowers extract in rats. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 406-416, 2011.
- ALVES, M.A.; SOUZA, A.C.M., ROJAS, G.G., GUERRA, N.B. Fruto de palma [*Opuntia ficus-indica* (L) Miller, cactaceae]: morfologia, composição química, fisiologia, índices de colheita e fisiologia pós-colheita. **Revista Iberoamericana de tecnologia Postcosecha**, v. 9, n. 1, p.16-25, 2008.
- ALVES, J.C.R. **Perspectivas de utilização da figueira-da-india no Alentejo: Caracterização de Opuntia SP. No Litoral Alentejano e na Tapada da Ajuda e estudo da instalação de um pomar**. 2011, 110f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrônômica)-Universidade técnica de Lisboa, Lisboa, 2011.
- ANDERSON, E.F. **The cactus family**. Timber Press, 776, 2001.
- ARAÚJO, J. M. A. **Química de alimentos: teoria e prática**. 3ª ed. – Viçosa: UF. p.335, 2004.
- BARBERA, G., INGLESE, P., PIMIENTA, E. Agroecología, cultivo y usos del nopal. **Estudio FAO Producción y Protección Vegetal**, p. 132- 225, 1999.
- BARBERA, G. **História e importância econômica e agroecológica**. In: Barbera, G.; Inglese, P.; Pimienta-Barrios, E. Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira. FAO/ Sebrae. p.1-11, 2001.

BARBOUR, E.K. Screening of selected indigenous plants of Lebanon for antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v.93, p.1-7, 2004.

BATISTA, R. D. S. R.; SILVA, R. A.; BRANDÃO, T. M.; VELOSO, T. R.; NEVES, J. A.; SANTOS, D. N. Bebida mista à base de goiaba (*Psidium guajava* L.) e palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*): desenvolvimento e aceitabilidade. **Archivos latino americanos de nutricion**, v. 60, p. 285-290, 2010.

BERNARDES, N.R.; PESSANHA, F.F.; OLIVEIRA, D.B. Alimentos Funcionais: Uma breve revisão. **Revista Ciência e Cultura**, v. 6, p. 11-19, 2010.

BETANCOURT- DOMÍNGUEZ, M. A.; HERNÁNDEZ- PÉREZ, T.; GRACÍA- SAUCEDO, P.; CRUZ-HERNÁNDEZ, A.; PAREDEZ- LÓPEZ, O. Physio-chemical changes in cladodes (nopalitos) from cultivated and wild cacti (*Opuntia* spp.). **Plant Foods for Human Nutrition**, v.61, p.115-119, 2006.

BLACK, J.G. **Microbiologia: fundamentos e perspectivas**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 829, 2002.

BORGES, E.L. **Evolução da cicatrização**. In: BORGES, E.L.; SAAR, S.R.C.; MAGALHÃES, M.B.B.; GOMES, F.S.L.; LIMA, V.L.A.N. Feridas: como tratar. 2 ed. Belo Horizonte: Coopmed, p.31-43, 2008.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. **Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos**. Brasília: Ministério da Saúde, (Série B. Textos Básicos de Saúde). p.60, 2006.

BRASIL. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC nº. 44, de 26 de outubro de 2010. Dispõe sobre o controle de medicamentos à base de substâncias classificadas como antimicrobianos, de uso sob prescrição médica, isoladas ou em associação e dá outras providências. Diário Oficial da União 2010.

BROOKS, G. F. **Microbiologia Médica**. 24 ed. São Paulo, p. 653, 2008.

BURT, S. Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods e a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 94, n. 3, p. 223-253, 2004.

BUSSMANN, R. W.; MALCA, G.; GLENN, A.; SHARON, D.; NILSEN, B.; PARRIS, B.; DUBOSE, D.; RUIZ, D.; SALEDA, J.; MARTINEZ, M.; CARILLO, L.; WALKER, K.; KUHLMAN, A.; TOWNESMITH, A. Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. **Journal of Ethnopharmacology**, v.137, n.1, p. 121-140, 2011.

CAILI, F., HUAN, S., QUANHONG, L. A review on pharmacological activities and utilization technologies of pumpkin. **Plant Foods for Human Nutrition**. v. 61, p. 73-80, 2006.

CANTWELL, M. Manejo pós-colheita de frutas e verdura de palma forrageira. In: BARBERA, G.; INGLESE, P.; BARRIOS, E. P. (Ed.). **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE/PB, p.123-139, 2001.

CARLOS, L.A.; AMARAL, K.A.S.; VIEIRA, I.J.C.; MATHIAS, L.; BRAZ-FILHO, R.; SAMARÃO, S.S.; VIEIRA-DA-MOTTA, O. *Rauvolfia grandiflora* (apocynaceae) extract interferes with staphylococcal density, enterotoxin production and antimicrobial activity. **Brazilian Journal of Microbiology**. v.41, p. 612-620, 2010.

CARVALHO, J.C.T. **Fitoterápicos anti-inflamatórios: aspectos químicos, farmacológicos e aplicações terapêuticas**. Ribeirão Preto: Tecmedd, p.480, 2004.

CAVALCANTE, M. F.; OLIVEIRA, M. C. C.; VELANDIA, J. R.; ECHEVARRIA, A. A síntese de 1,3,5,- triazinas substituídas e avaliação da toxicidade frente a *Artemia salina* Leach. **Química Nova**, v. 3, n. 1, p. 20-22, 2000.

CHAVES, A.J.L. **Viva melhor com as plantas medicinais**. Lisboa, Edições Une, 2008.

CHEUNG, L.M., CHEUNG, P.C.K.; OOI, V.E.C. Antioxidant activity and total phenolics of edible mushroom extracts. **Food Chemistry**, v.80, p.249-255, 2003.

CHIACCHIO, F. P. B.; MESQUITA, A. S.; SANTOS, J. R. Palma forrageira: uma oportunidade econômica ainda desperdiçada para o semiárido baiano. **Bahia Agrícola**, v.7, p. 39-49, 2006.

CLANCY, D.; BIRDSALL, J. Flies, worms and the Free Radical Theory of ageing. **Ageing Research Review**, v. 12. p. 404-412, 2013.

COHEN, M.L. Epidemiology of drug resistance: implications for a post antimicrobial era. **Science**, v.257, p.1050-1055, 1992.

CORRALES-GARCÍA, J.; PEÑA-VALDIVIA, C. B.; RAZO-MARTÍNEZ, Y.; SÁNCHEZ-HERNÁNDEZ, M. Acidity changes and pH-buffering capacity of nopalitos (*Opuntia* spp.). **Postharvest Biology and Technology**, v. 32, p. 169-174, 2004.

COSTA, L. M. **Avaliação da Atividade Antioxidante e Antimicrobiana do Gênero *Capsicum***. 2007. Dissertação (Mestre em Ciências Ambientais) - Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais. Universidade Comunitária Regional de Chapecó, Chapecó, 2007.

COSTA, R. G.; FILHO, E. M. B.; MEDEIROS, A. N. D.; GIVISIEZ, P. E. N.; QUEIROGA, R. D. C. R. D. E.; MELO, A. A. S.. Effects of increasing levels of cactus pear (*Opuntia ficus-indica* L. Miller) in the diet of dairy goats and its contribution as a source of water. **Small Ruminant Research**, v. 82, p. 62-65, 2009.

CRISAN, I.; ZAHARIA, C. N.; POPOVICI, F.; JUCU, V.; BELU, O.; DASCALU, C.; MUTIU, A.; PETRESCU, A. Natural propolis extract Nivcrisol in the treatment of acute and chronic rhinopharyngitis in children. **Romanian Journal of Virology**, v. 46, n. 3-4, p. 115-133, 1995.

CUNHA, A.P., SILVA A.P., ROQUE, O.R. **Plantas e Produtos Vegetais em fitoterapia**. Lisboa, Fundação Calouste Gulbenkian, 2003.

DANTAS, L.I.S. Atividade antibacteriana do óleo essencial de *Lippia gracilis schauer* sobre patógenos de importância na indústria de alimentos. **Holos**, a.26, v.5, p. 114- 123, 2010.

DAS, K.; TIWARI, R.K.S.; SHRIVASTAVA, D.K. Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. **Journal of Medicinal Plants Research**, v. 4, n. 2, p. 104-111, 2010.

DE POLO, K.F. **A short textbook of cosmetology**. Ed. 1, Verlag Fur Chemische Industrie, p.335-423, 1998.

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, cap. 18, p. 853-916, 2001.

DOUGHARI, J. H.; EL-MAHMOOD, A. M.; TYOYINA, I. Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L). **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 2, n. 1, p. 7-13, 2008.

DUARTE, M.C.T. Atividade antimicrobiana de plantas medicinais e aromáticas utilizadas no Brasil. Construindo a história dos produtos naturais. **Multiciência**, v.7, n.4, p.41-44, 2006.

ENNOURI, M., FETOUI, H., BOURRET, E., ZEGHAL, N., ATTIA, H. Evaluation of some biological parameters of *Opuntia ficus indica*. 2. Influence of a seed oil supplemented diet on rats. **Bioresource Technology**, v.97, n. 12, p. 1382-1386, 2006.

FEITOSA-TELES, F.F., STULL, J.W., BROWN, W.H., WHITING, F.M. Amino and acids of the prickly pear cactus (*Opuntia ficus-indica*). **Journal of the Science of Food and Agriculture**. v. 35, p. 421-425, 1984.

FARNSWORTH, N. R. Relative safety of herbal medicines. **Herbalgram**, v.29, n.12, p.36-39, 1993.

FEUGANG, J. M.; KONARSKI, P.; ZOU, D.; STINTZING, F. C.; ZOU, C. Nutritional and medicinal use of Cactus pear (*Opuntia* spp.) cladodes and fruits. **Frontiers in Bioscience**, v. 11, p. 2574-2589, 2006.

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

FOGLIO, M. A., QUEIROGA, C. L., SOUSA, I. M. O., RODRIGUES, E. A. F. Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêuticos: Um Modelo Multidisciplinar. **Multiciência: Revista Interdisciplinar dos Centros e Núcleos da Unicamp**, 2006.

FONTANAY, S; GRARE, M.; MAYER, J.; FINANCE, C.; DUVAL, R.E.; Ursolic, oleanolic and betulinic acids: Antibacterial spectra and selectivity indexes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 120, p.272-276, 2008.

FORZZA, R.C. Introdução. In **Lista de Espécies da Flora do Brasil**. Jardim Botânico do RJ, 2013.

FRANCESCHINI FILHO, S. **Plantas terapêuticas**. São Paulo: Editora Organizações Andrei, 2004.

FURTADO, G.H.C; PERDIZ, L.B; SANTANA, I.L; CAMARGO, M. M. S. C. R; PARREIRA, F.C; ANGELIERI, D.B; MEDEIROS, E. A.S.; Impact of a Hospital-wide Antimicrobial Formulary Intervention on the Incidence of Multidrug-Resistant Gram-negative Bacteria. **American Journal of Infection Control**, v.36l, p.661-4, 2008.

GALATI, E.M.; MONFORTE, M.T.; TRIPODO, M.M.; D'AQUINO, A.; MONDELLO, M.R. Antiulcer activity of *Opuntia ficus indica* (L.) Mill. (Cactaceae): ultrastructural study. **Journal Ethnopharmacology**, v. 76, p. 1–9, 2001.

GAYOTTO, L. C. C.; ALVES, V.A. **Doenças do fígado e vias biliares**. v. 1. Rio de Janeiro: Atheneu, p. 664, 2001.

GARCÍA, J.C.; VALDIVIA, C.B.P.; MARTÍNEZ, Y.R. E.; HERNÁNDEZ, M.S. Acidity changes and pH-buffering capacity of nopalitos (*Opuntia* spp.). **Postharvest Biology and Technology**, v.32, n. 2, p.169-174, 2004.

GARCÍA, J.C., SILVA, J.L.H. Cambios em la calidad postcosecha de variedades de tuna com y sin semilla. **Revista Fitotecnia Mexicana**, v. 28, n. 1, p 9-16, 2005.

GINESTRA, G.; PARKER, M. L.; BENNETT, R. N.; ROBERTSON, J.; MANDALARI, G.; NARBAD, A.; LO CURTO, R. B.; BISIGNANO, G.; FAULDS, C. B.; WALDRON, K. W. Anatomical, chemical, and biochemical characterization of cladodes from prickly pear [*Opuntia ficus-indica* (L.) Mill.]. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, p. 10323-10330, 2009.

GONÇALVES, C. L. **Bacteriostasia, citotoxicidade, atividade antioxidante e sinergismo com antibacterianos comerciais de plantas bioativas com indicativo medicinal**. 2014, 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Área do conhecimento: Sanidade Animal)- Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

GONZÁLEZ-LAMOTHE, R.; MITCHELL, G.; GATTUSO, M.; DIARRA, M. S.; MALOUIN, F.; BOUARAB, K. Plant Antimicrobial Agents and Their Effects on Plant and Human Pathogens. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 10, p. 3400-3419, 2009.

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

GUEDES, C. C.; OLIVEIRA, J. S.; FERNANDES, M. F.; OLIVEIRA, R.; DEIRO, T. C. B. J.; SOUSA, V. **Broto de Palma, sabor e nutrição**. Recife, PE: SEBRAE/FAEPE, p.48, 2004.

GUERRA M.P.; NODARI R.O. **Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos**. In: SIMÕES C.M.O., SCHENKEL E.P., GOSMANN G., MELLO J.C.P., MENTZ L.A., PETROVICK P.R. (Org.). **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 3.ed. Porto Alegre- Florianópolis: Ed Universidade, p.13-40, 2001.

GUIMARÃES D. O.; MOMESSO, L. S.; PUPO, M. T. Antibióticos: Importância Terapêutica e Perspectivas Para a Descoberta e Desenvolvimento de Novos Agentes. **Química Nova**, v. 33, n. 3, p.667-679, 2010.

GUSMÃO, R. P. **Avaliação dos aspectos tecnológicos envolvidos na obtenção da farinha de palma forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill).** 2011. 68 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

HAIDA, K.S.; PARZIANELLO, L.; WERNER, S.; GARCIA, D. R.; INÁCIO, C. V. Avaliação *in vitro* da atividade antimicrobiana de oito espécies de plantas medicinais. **Arquivo de Ciências da Saúde Unipar**, v. 11, p. 185-192, 2007.

HALLIWELL, B. Free radicals and antioxidants – quo vadis? **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 32, p. 125-130, 2011.

HOEFEL, R.; VIDOTTI, C.F.F.; MENEZES, E. S.; PINHEIRO, S. Ações que estimulam o uso racional de antimicrobianos. **Boletim Farmacoteca.**, v. 11, p. 1-4, 2006.

INGLESE, P.; BASILE, F.; SCHIRRA, M. Cactus Pear Fruit Production. In: Nobel, P.S.(Ed.) **Cacti. Biology and Uses**. University of California Press, Berkeley, 2002.

KANWAR A.S. Brine shrimp (*Artemia salina*) – a marine animal for simple and rapid biological assays. **Journal of Chinese Clinical Medicine**. v. 2, n. 4, p. 236-240, 2007.

KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: Um futuro promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, n.30, v.3, p.241-248, 2009.

KUMAR, C. G; MONGOLLA, P; JOSEPH, J; NAGESWAR, Y.V.D; KAMAL, A. Antimicrobial Activity from the Extracts of Fungal Isolates of Soil and Dung Samples from Kaziranga National Park, Assam, India. **Journal de Mycologie Médicale**, v.20, p.283-289, 2010.

LEO, M.; BRUZUAL DE ABREU, M.; PAWLOWSKA, A. M.; CIONI, P. L.; BRACA, A. Profiling the chemical content of *Opuntia ficus indica* flowers by HPLC-P-DA-ESI-MS and GC-EIMS analyses. **Phytochemistry Letters**, v. 3. n.1, p.48-52, 2010.

LIU, J.; WANG, C.; WANG, Z.; ZHANG, C.; LU, S.; LIU, J. The antioxidant and free-radical scavenging activities of extract and fractions from corn silk (*Zea mays* L.) and related flavone glycosides. **Food Chemistry**, v. 126, p. 261-269, 2011.

LÓPEZ, R.; ITA, A.; VACA, M. Drying of prickly pear cactus cladodes (*Opuntia ficus indica*) in a forced convection tunnel. **Energy Conversion and Management**, v. 50, n. 9, p. 2119- 2126, 2009.

LORA, J. **Avaliação da toxicidade aguda do extrato hidroalcoólico de folhas de *Eugenia uniflora* L. (Myrtaceae).** 2007, 59f. Dissertação (Ciências Ambientais)- Universidade do Extremo Sul Catarinense, 2007.

MACHADO, B. F. M. T.; FERNANDES JÚNIOR, A. Óleos Essenciais: Aspectos gerais e usos em terapias naturais. **Cadernos Acadêmicos**, v. 3, n. 2, p. 105-127, 2011.

MACHADO, H.; NAGEM, T.J.; PETERS, V.M.; FONSECA, C.S.; OLIVEIRA, T.T. Flavonóides e seu potencial terapêutico. **Boletim do Centro de Biologia Reprodução**, UFJF, v. 26, p. 33-39, 2008.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JR., V. F.; GRYNBERG, N. F.; ECHEVARRIA, A. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MADIGAN, M.T. **Microbiologia de Brock**, 12ª ed. São Paulo: Artmed, p. 1128, 2010.

MALAININE, M. E.; DUFRESNE, A.; DUPEYRE, D.; MAHROUZ, M.; VUONG, R.; VIGNON, M. R. Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus indica*. Cellulose extraction and characterisation. **Carbohydrate Polymers**, v. 51, n.1, p. 77-83, 2003.

MARIOD, A.A.; IBRAHIMA, R.M.; ISMAILA, M.; ISMAILA, N. Antioxidant activities of phenolic rich fractions (PRFs) obtained from black mahlab (*Monechma ciliatum*) and white mahlab (*Prunus mahaleb*) seedcakes. **Food Chemistry**, v. 118, n. 1, p. 120-127, 2010.

MATTOS, C.W. **Associação de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*, Mill) e feno de erva-sal (*Atriplex nummularia* L) em dietas para cordeiros em confinamento**. 2009. 101 f. Tese (Programa de Doutorado Integrado UFRPE/UFPB/UFC) Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 2009.

MENEZES, R. S. C.; SIMÕES, D. A.; SAMPAIO, E. V. S. B. **A palma no Nordeste do Brasil**: conhecimento atual e novas perspectivas de uso. Recife: Ed. Universitária da UFPE, p. 13-213, 2005.

MICHILES, E.; BOTSARIS, A.S. Medicamentos sintéticos e Fitoterápicos: potencialidades de equivalência. **Fitos**, v. 1, n.1, p. 36-42, 2005.

MISHRA, K.; OJHA, H.; CHAUDHURY, N. K. Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. **Food Chemistry**, v.130, p. 1036–1043, 2012.

MONTHANA, R.A.A.; LINDEQUIST, U. Antimicrobial activity of some medicinal plants of the island Soqotra. **Journal Ethnopharmacology**, v.96, p.177-181, 2005.

MOREIRA, A. V. B.; MANCINI-FILHO, J. Influência dos compostos fenólicos de especiarias sobre a lipoperoxidação e o perfil lipídico de ratos. **Revista de Nutrição**, v.17, n.4, p.411-420, 2004.

MOREIRA, V. S. **Atividade antioxidante e caracterização físico-química de variedades de urucueiros *in natura* e encapsulado**. 2013. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos, área de Concentração em Engenharia de Processos de Alimentos) - Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Itapetinga, 2013.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para o laboratório Princípios e Interpretações**. Ed. Educ, 4ª edição, 2003.

MOUSSA-AYOUB T.; EL-SAMAHY S.; KROH L.; ROHN S. Identification and quantification of flavonol aglycons in cactus pear (*Opuntia ficus indica*) fruit using a commercial pectinase and cellulose preparation. **Food Chemistry**. v. 124, n. 3, p. 1177-1184, 2011.

NASCIMENTO, G. G. F.; LOCATELLI, J.; FREITAS, P. C.; SILVA, G. L. Antibacterial activity of plant extracts and phytochemicals on antibiotic-resistant bacteria. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 31, n. 2, p. 247–256, 2000.

NASCIMENTO, J. E.; LACERDA, E. U.; NASCIMENTO, V. T.; MELO, J. G.; ALVES, B. S.; SILVA, L. G. M.; RAMOS, M. A.; LIMA, C. S. A.; ALBUQUERQUE, U. P.; AMORIM, E. L. C. **Produtos à base de Plantas Medicinais Comercializados em Pernambuco - Nordeste do Brasil**. Acta Farm. Bonaerense, v 24, n 1, p.113-122, 2005.

NCCLS. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard - Six Edition. NCCLS documento M7-A6 (ISBN 1- 56238-486-4). NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087- 1898 US, 2003.

NDHLALA, R.; MOYO, M.; VAN STADEN, J. Natural antioxidants: fascinating or mythical biomolecules. **Molecules**, v.15, p.6905-6930, 2010.

NECCHI, R. M.M. **Farmacobotânica, atividade antiinflamatória e parâmetros bioquímicos de Nopalea cochenillifera (L.) Salm- Dick (Cactaceae)**. 2011, 60f. Dissertação (Mestrado em Ciências farmacêuticas)- Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, 2011.

NEWMAN, D.J.; CRAGG, G.M. Natural products of therapeutic importance. **Natural Products**, v. 2, p. 623- 650. 2010.

NIKI, E. Assessment of antioxidant capacity *in vitro* and *in vivo*. **Free Radical Biology and Medicine**, v.49, p.503-515, 2010.

NUNES, C. S. Usos e aplicações da palma forrageira como uma grande fonte de economia para o semiárido nordestino. **Revista Verde**, v.6, n.1, p.58-66, 2011.

OECD - Organisation for Economic Co-operation and Development. Guideline 423: **Acute Oral Toxicity – Acute Toxic Class Method**. Paris: Head of Publications Service, p. 1-14, 2001.

OLIVEIRA, A. B.; LONGH, J. G.; ANDRADE, C. A.; MIGUEL, O. G.; MIGUEL, M. D. A normatização dos fitoterápicos no Brasil. **Visão Acadêmica**, v. 7, n. 2, 2006.

PALMEIRA, J.D.; FERREIRA, S.B.; SOUZA, J.H.; ALMEIDA, J.M.; FIGUEIREDO, M.C.; PEQUENO, A.S.; ARRUDA, T.A.; ANTUNES, R.M.P.; CATÃO, R.M.R. Avaliação da

atividade antimicrobiana in vitro e determinação da concentração inibitória mínima (CIM) de extratos hidroalcoólico de angico sobre cepas de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, v.42, n.1, p. 33-37, 2010.

PÂNICO, A.M.; CARDILE, V.; GARUFI, F.; PUGLIA, C.; BONINA F.; RONSISVALLE, S. Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the metabolismo of human chondrocyte cultures. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 2, p. 315-321, 2007.

PARK, S.C.; KIM, J.Y.; LEE, J.K.; HWANG, I.; CHEONG, H.; NAH, J.W.; HAHM, K.S.; PARK, Y. Antifungal mechanism of a novel antifungal protein from pumpkin rinds against various fungal pathogens. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 57, p. 9299-9304, 2009.

PÉREZ – CACHO, M.P.R.; SOLDEVILLA, H.G.; GARCÍA, J.C.; MONTES, A.H. Sensory characterization of nopalitos (*Opuntia* spp.) **Food Research International**, v.39, n. 3, p.258-293, 2006.

PLANTAMED. Disponível em:
http://www.plantamed.com.br/plantaservas/especies/Opuntia_ficus-indica.htm. Acesso em: 03 de Julho de 2015.

PODSEDEK, A. Natural antioxidants and antioxidant capacity of Brassica vegetables: A review. **LWT - Food Science Technology**, v. 40, p. 1-11, 2007.

POLITI F.A.Z.; PIETRO R.C.L.; MOREIRA R.R.D. **Estudos farmacognósticos e avaliação de atividades biológicas de extratos obtidos das cascas pulverizadas de *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (Humiraceae)**. 2009. Dissertação (Mestrado em Desenvolvimento de fármacos e medicamentos) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Araraquara, 2009.

PUEYOA, M.J; GAITEB, F.B; VILLARC, R.A; MONTEROC, J.G. Multirresistencia antibiótica en unidades de críticos. **Jornal da Associação Brasileira de Medicina Intensiva**, v.35, p.41-53, 2011.

QUEIROZ, A. F. S.; MELO, D. S.; MELO, D. F. A.; MEDEIROS, R.I. **Avaliação da toxidade aguda e subaguda do vegetal *Lafoensia pacari* A. St.- Hill**. 2013, 22f. TCC- Faculdade União de Goyazes, 2013.

RANG, H.P; DALE, M.M, RITTER, J.M. **Farmacologia**. 4 ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2001.

RAVISHANKAR, K.; KIRANMAYI, G.V.N.; APPA REDDY, G.V.; SOWJANYA, V.V.L.; SAINADH, V.B.; DURGA, V.G.L.; PRASAD, V.S.; SWAMINAIDU, P.V.; PRASAD, T. Preliminary phytochemical screening and in-vitro antibacterial activity of *Cucurbita maxima* seed extract. **International Journal of Research in Pharmacy and Chemistry**. v. 2, p. 86-91, 2012.

REYES-AGÜERO, J. A.; AGUIRRE RIVERA, J. R.; FLORES FLORES, J. L.. Variación morfológica de *Opuntia* (Cactaceae) en relación con su domesticación en la altiplanicie meridional de México. **Interciencia**, v. 30, n. 8, p. 476-484, 2005.

REINOLDS, S. G.; ARIAS, E. Introduction. In: JACOBO, C. M.; GONZÁLEZ, S. P. (Ed.). **Cactus (*Opuntia* spp.) as forage**. Roma: FAO, p. 1-5, 2001.

REINOLDS, S.G.; ARIAS, E. **General background on opuntia**. 2004. Disponível em: <http://www.fao.org/DOCREP/005/2808E/y2808e04.htm>. Acesso em 12 de Julho de 2015

REPO-CARRASCO-VALENCIA, R; HELLSTROM, J.K; PIHLAVA, J.K; PIHLAVA, J.M. Flavonoids and other phenolic compounds in Andean indigenous grains: Quinoa (*Chenopodium quinoa*), kaniwa (*Chenopodium pallidicaule*) and kiwicha (*Amaranthus caudatus*). **Food Chemistry**, v. 120, p. 128–133, 2010.

RESCHKE, A.; MARQUES, L. M.; MAYWORM, M. A. S. Atividade antibacteriana de *Ficus benjamina* L. (Moraceae). **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 9, n. 2, p. 67-70, 2007.

RIBEIRO, E. M. O.; SILVA, N. H.; LIMA FILHO, J. L.; BRITO, J. Z.; SILVA, M. P. C. Study of carbohydrates present in the cladodes of *Opuntia ficus indica* (fodder palm), according to age and season. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, n. 4, p. 933-939, 2010.

RIOS, A.O.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Bixin and lycopene modulation of free radical generation induced by cisplatin–DNA interaction. **Food Chemistry**. v. 113, p. 1113-1118, 2009.

RODRIGUES, A. C. F.; DA COSTA, J. F.; SILVA, A. L.; DO NASCIMENTO, E. P.; SILVA, F. R. G.; DE SOUZA, L. I. O.; AZEVEDO, R. R. S.; ROCHA, T. J. M.; DOS SANTOS, A. F. Atividade antibacteriana, antioxidante e toxicidade do extrato etanólico de *Senna obtusifolia*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 10, p.43 – 53, 2013.

RODRÍGUEZ-FÉLIX, A., CANTWELL, M. Developmental changes in the composition and quality of Prickly pear cactus cladodes (nopalitos). **Plants Food for Human Nutrition**, v. 38, p. 83-93, 1988.

ROGER, J.P. Figueira-da-índia, **Revista Saúde e Lar**, nº731, p.35, 2008.

SÁENZ, C. Características y composición química de los nopales. In: SÁENZ, C.; BERGER, H.; GARCÍA, J. C.; GALLETI, L.; CORTÁZAR, V. G.; HIGUERA, I.; MONDRAGÓN, C.; RODRÍGUEZ-FÉLIX, A.; SEPÚLVEDA, E.; VARNERO, M. T. **Utilización Agroindustrial del Nopal**. Roma: FAO, p. 7-22, 2006.

SANTOS PIMENTA, L. P.; PINTO, G. B.; TAKAHASHI, J. A.; SILVA, L. G.; BOAVENTURA, L. A. Biological screening of Annonaceos Brazilian medicinal plants using *Artemia salina* (brine shrimp test). **Phytomedicine**, v. 10, n. 2-3, p. 209-212, 2003.

SANTOS, D. C.; FARIAS, I.; LIRA, M. A.; SANTOS, M. V. F.; ARRUDA, G. P.; COELHO, R. S. B.; DIAS, F. M.; MELO, J. N. **Manejo e utilização da palma forrageira (*Opuntia* e *Nopalea*) em Pernambuco**. Recife: IPA, p. 48, 2006.

SANTOS, M.M; NUNES, M.G.S ; MARTINS, R.D. Uso empírico de Plantas Medicinais parágrafo Tratamento de diabetes. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v.14, n.2, p. 327-334, 2012.

SANTOS, M.M. **Perfil Fitoquímico da palma forrageira (*Opuntia ficus indica*) e Atividade Cicatrizante *in vivo***. 2013,113f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia)- Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SCHAFFER, C.J., NANNEY, L.B. Cell biology of wound healing. **International Review of cytology**, v. 169, p.151-181, 1996.

SCHEINVAR, I. Taxonomia das opuntias utilizadas. BARBERA, G.; INGLESE, P. (Eds). **Agroecologia, cultivos e usos da palma forrageira**. Paraíba: SEBRAE/PB, p. 20-27, 2001.

SEBRAE, Pb. **Agroecologia, cultivo e usos da palma forrageira**. SEBRAE, 2001.

SILVA, C.C.F.; SANTOS, L.C. Palma Forrageira (*Opuntia ficus indica* Mill) como alternativa na alimentação de ruminantes. **Revista Electrónica de Veterinaria REDVET**. v. 7, n. 10, 2006.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. Florianópolis: Editora UFRGS, 2004.

SOARES, E.I.; MENDONÇA, L.G. Chá ou Fitoterápico? Um resgate histórico de como a legislação sanitária encara a planta medicinal desde o Brasil colônia. **Perspectivas da Ciência e Tecnologia**, v.2, n.1/2, 2010.

SOFIATI, F. **Estudo fitoquímico e atividades biológicas preliminares de extratos de *Polygonum acre* (Polygonaceae) H.B.K. e *Synadenium carinatum* Boiss. (Euphorbiaceae)**. 2009, 100f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Estadual Paulista, Araraquara, SP, 2009.

SOUSA, C. M. D. M.; SILVA, H. R. E.; VIEIRA-JR., G. M.; AYRES, M. C. C.; COSTA, C. L. S. D.; ARAÚJO, D. S.; CAVALCANTE, L. C. D.; BARROS, E. D. S.; ARAÚJO, P. B. D. M.; BRANDÃO, M. S.; CHAVES, M. H. Fenóis totais e atividade antioxidante de cinco plantas medicinais. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 351-355, 2007.

SOUSA, F.C; OLIVEIRA, E.N.A; SANTOS, D.C.; OLIVEIRA, F.A.A.; MORI, E. **Uso de plantas medicinais (fitoterápicos) por mulheres da cidade de Icó-CE**. BIOFAR. v.5, n.1, 2011.

SOUZA, P. L. M. **Estudo fitoquímico e citotóxico das folhas e flores da *Caesalpinia pulcherrima* (variação de cor amarela) Swatz (Fabaceae)**. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Estadual de Goiás - UEG, Anápolis, 2011.

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

TAJKARIMI, M.M.; IBRAHIM, S.A.; CLIVER, D.O. Antimicrobial herb and spice compounds in food. **Food Control**. v. 21, p. 1199-1218, 2010.

TAKAMURA, O. S. Editorial: Tendências no estudo de Plantas medicinais. **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v.12, n.3, p.165-274, 2008.

TANG, X; TAN, C; ZHANG, X; ZHAO, Z; XIA, X; WU, B; GUO, A; ZHOU, R; CHEN, H.; Antimicrobial Resistances of Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* isolates from Swine in China. **Microbial Pathogenesis** , v. 50, p.207-212, 2011.

TROMBETTA, D.; PUGLIA, C.; PERRI, D.; LICATA, A.; PERGOLIZZI, S.; LAURIANO, E. R.; DE PASQUALE, A.; SAIJA, A.; BONINA, F. P. Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. **Phytomedicine**, n.13, p. 352-358, 2006.

UCHÔA, A.D.A. **Perfil fitoquímico e avaliação da bioatividade: antioxidante e antimicrobiana de extratos de folhas da *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze (Amaranthaceae).** 2014 90f, Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL₅₀”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, Goiânia, v.3, p.93-98, 2006.

VEIGA JUNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, 2005.

VERAS, R. M. L.; FERREIRA, M. D. A.; CARVALHO, F. F. R. D.; VÉRAS, A. S. C. Farelo de Palma Forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) em substituição ao Milho. 1. Digestibilidade Aparente de Nutrientes. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Recife, v. 31, n.3, p. 1302-1306, 2002.

VIEIRA, S.C.H.; SÓLON, S.; VIEIRA, M.C.; ZÁRATE, N.A.H. Levantamento de fitoterápicos manipulados em farmácias magistrais de Dourados-MS. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, n. 1, p. 28-34, 2010.

VONBERG, R.P; WOLTER, A; CHABEMY, I. F; KOLA, A; ZIESING, S; SUERBAUM, S; GASTMEIER, P. Epidemiology of Multi-Drug-Resistant Gram-Negative Bacteria: Data from an University Hospital Over a 36-month period - Int. J. Hyg. **Environmental Health**, v. 211, p. 251–257, 2008.

5. CAPÍTULO 1

Bioactivity assessment: antimicrobial and antioxidant activities of mucilage from fodder palm (*Opuntia ficus indica* L. Mill) cladodes

C.S.Silva^{a,b}, A.D.A.Uchôa^b, H.A.M.F.Silva^d, M.S.Melo^b, R.A.Silva^a, P.G.Cadena^c,
M.C.B.Pimentel^{a,b}; M.P.C.Silva^{a,b*}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, 50670-901 Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 Recife-PE, Brasil.

^c Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife – PE, Brasil.

^d Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, 50670-901 Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

*Corresponding author

M.P.C.Silva, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 – Cidade Universitária, Recife –PE, Brasil.

Telephone number: +55 81 2126 8484; Fax number: +55 81 2126 8485

e-mail: mariadapazc@gmail.com.br

Abstract

Background: In recent decades there has been significant progress involving pharmacological and phytochemical studies of medicinal plants in order to obtain new compounds with therapeutic properties. *Opuntia ficus indica* (Cactaceae) cladode contain a large amount of active ingredients, particularly antioxidant constituents including vitamin C, vitamin E, carotenoids, glutathione, flavonoids and phenolic acids, thus, making this plant present various therapeutic properties.

Purpose: The study aimed to evaluate the *Opuntia ficus indica* L. Mill cladodes mucilage (OFCM) for phenolic and flavonoids contents, *in vitro* evaluate antioxidant and antimicrobial activities and evaluation of brine shrimp lethality test.

Methods: Total phenolic content was determined by the Folin–Ciocalteu method and flavonoids contents were estimated by the AlCl_3 method. Antioxidant activity was detected by the method of ABTS and DPPH radical scavenging activity and total antioxidant capacity (TAC). The antimicrobial activity by the broth microdilution to determine the Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and Minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC/MFC) against twelve microorganisms among them: Gram-positive and Gram-negative bacteria and yeast, while evaluation of brine shrimp lethality test was estimated using *Artemia salina*.

Results: The results demonstrated that total phenolic contents was $64,9 \pm 0.6 \mu\text{g GAE/ml}$ of OFCM and the amount of total flavonoids in OFCM assessed was $31.8 \pm 0.4 \mu\text{g QE/ml}$ of OFCM. Significant results were found for the antioxidant activity, inhibition percentage the ABTS was $65.93 \pm 2.70\%$ to $98.40 \pm 0.40\%$ equivalents to 1443.30 ± 60.62 to 2173.30 ± 8.80 to TEAC ($\mu\text{M Trolox}$) in a period of 6 min to 120 min, inhibition percentage of the DPPH radical formation was $64.03 \pm 7.8\%$ and total antioxidant capacity (TAC) was $48.42 \pm 0.3\%$ AscAE and $67.2 \pm 0.4\%$ GAE. The OFCM showed antimicrobial capacity for: *Micrococcus luteus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans* and *Pseudomonas aeruginosa* - CI. The lethal cytotoxicity (LC_{50}) for *Artemia salina* was $584.11 \mu\text{g/ml}$.

Conclusion: The results showed that *Opuntia ficus indica* L. Mill mucilage cladodes exhibited antimicrobial and antioxidant activities with low toxicity.

Keywords: *Opuntia ficus indica*; antioxidant activity; minimum inhibitory concentration; brine shrimp lethality test

Abbreviations:

ABTS: 2,2-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid; AlCl₃: Aluminium chloride; AscAE: ascorbic acid equivalent; ATCC: American Type Culture Collection; BST: Brine shrimp lethality test; CI: Clinical isolates; CLSI: Clinical Laboratory Standards Institute; DMSO: dimethylsulphoxide; DPPH: 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl; FRS: Free radical scavenging; GAE: Gallic acid equivalent; HC: Hospital das Clinicas; LC₅₀: Lethal cytotoxicity; MIC: Minimum Inhibitory Concentration; MBC: Minimum bactericidal concentration; MFC: Minimum fungicidal concentration; Na₂CO₃: Sodium carbonate; OECD: Organization for Economic Cooperation and Development; OFCM: *Opuntia ficus indica* L. Mill cladodes mucilage; ORSA: *Staphylococcus aureus* Oxacillin resistant; QE: Quercetin equivalent; ROS: reactive oxygen species; TAC: Total antioxidant capacity; TEAC: Trolox Equivalent Antioxidant Capacity; UFPEDA: Federal University of Pernambuco Department of Antibiotics.

1. Introduction

The production of drugs and pharmacological treatment of numerous pathologies had their beginning with the use of medicinal plants (Pinto et al., 2006). In recent years, there has been increasing interest in the exploitation of natural sources, particularly with regard to plants for pharmaceutical use, and, in the last decade there has been a significant growth in the use of herbal medicines (Bresolin and Cechinel Filho, 2010). The knowledge acquired by the popular culture of medicinal plants is being encouraged experimental research in order to identify the possible potential bioactive of these plants, so that they can be employed as the active principle for the pharmaceutical industry (Pinto et al., 2006).

One of the factors that most contribute to the bioactive potential of plant research is the problem of resistance to conventional antibiotics acquired by various microorganisms. This resistance comes from the inappropriate use of these drugs among the population. The bacteria and fungi resistance to conventional antibiotics represents a serious public health problem (Ponzi et al, 2010; Leal et al, 2011). Due to the increasing microbial drug resistance, the search for new antimicrobial agents from plants is intense (Radulovic et al., 2013). Plants with higher antimicrobial activity are those rich in polyphenols, flavonoids and tannins (Doughari et. al, 2008).

The electron transfer is a fundamental chemical processes for cell survival. But this dependence has a side effect that is the production of free radicals and other reactive oxygen species (ROS) that can cause oxidative damage (Neves et al., 2009; Alves et al., 2010). The excess of free radicals leads to deleterious effects such as damage to DNA, proteins and organelles, such as mitochondria and membranes, causing changes in the structure and cellular functions (Freitas et al., 2014). The discovery of the deleterious effects of free radicals and their relation to certain diseases drive the search for new substances capable of preventing or minimizing oxidative damage to living cells, then plants are a good alternative as natural antioxidants (Neves et al, 2009;. Alves et al, 2010).

Opuntia ficus indica (L.) Mill., a member of the Cactaceae family, is native from Mexico, widely distributed throughout Central America, South America, Australia, South Africa and Mediterranean countries (De Leo et al., 2010). It is an exotic cactaceous of xerophytic, characteristic with adaptation to adverse conditions of semi-arid. It can be easily found in the state of Pernambuco, Brazil. It is estimated in Northeast Brazil, approximately 500 000 cultivated hectares of this cactus (Oliveira et al., 2011).

Cladodes of this plant named “Nopalitos” are consumed mainly as staple food, but according to Mexican popular medicine, some diseases like diabetes mellitus, blood glucose levels, hyperlipidemy, obesity and gastrointestinal disorders can be alleviated by eating this vegetable (Corrales-Garcia et al., 2004). The components obtained from the cladodes contain a large amount of active ingredients, particularly antioxidant constituents including Vitamin C, Vitamin E, carotenoids, glutathione, flavonoids and phenolic acids etc. (Panico et al., 2005).

In addition to study the bioactivity is important evaluate the cytotoxicity of plants used in traditional medicine, for greater safety of use. The lethality assay with *Artemia salina* allows the assessment of overall toxicity and therefore is regarded as essential in bioassay study of compounds with potential biological activity (Uchôa, 2014).

Therefore, this study aimed to evaluate lethal toxicity (LC₅₀) using *Artemia salina*, performed dosage of phenolic compounds (polyphenols and flavonoids), investigate the antioxidant and antimicrobial activities by the broth microdilution on the mucilage fodder palm cladodes (*Opuntia ficus indica*).

2. Materials and methods

2.1 Chemicals

Ascorbic acid, 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH), gallic acid, quercetin, ascorbic acid, aluminium chloride (AlCl_3), sodium carbonate (Na_2CO_3), trolox reagents were obtained from Sigma (Sigma, Aldrich®). Folin–Ciocalteu reagent was purchased from Merck (Darmstadt, Germany). All other chemicals used were of analytical grade.

2.2 Plant material and preparation of the mucilage

Opuntia ficus indica (fodder palm) used to produce mucilage (tertiary and quaternary cladodes) was collected in April/2011, in the Experimental Station of the Instituto Agronômico de Pernambuco (IPA) of Caruaru city in the semiarid region of Pernambuco State in the Northeast of Brazil. The cladodes without thorns were washed in distilled water, cut in small pieces (about 5 cm) and crushed in industrial blender for 15 minutes and filtered in gauze. The supernatant was separated and called OFCM.

2.3. Determination of total phenolic content

Total phenolic content in the mucilage was determined by the Folin–Ciocalteu method (Li et al., 2008): An aliquot 0.2 ml of diluted sample were added to 1 ml of 1:10 diluted Folin–Ciocalteu reagent. After 4 min, 0.8 ml of Na_2CO_3 solution (75 g/l) was added. After 2 hours of incubation at room temperature, protected from light, the absorbance at 765 nm was measured in Ultrospec 3000 *pro*. Gallic acid (0–500 $\mu\text{g/ml}$) was used for calibration of standard curve. All tests were carried out in triplicate and the results were expressed as gallic acid equivalents ($\mu\text{g GAE/ml}$ of the OFCM).

2.4 Determination of total flavonoid content

The flavonoids contents were estimated by the AlCl_3 method (Lamaison et al., 1990): 0.5 ml of OFCM was mixed with 0.5ml of 2% methanolic AlCl_3 . The absorbance was measured 10 min later at 430 nm in Analytik Ultrospec 3000 *pro*, spectro-photometer. Quercetin (0 – 35

µg/ml) was used as a standard for calibration curve. All tests were carried out in triplicate and the amount of flavonoids was expressed as quercetin equivalents (µg QE/ml of the OFCM).

2.5 Antioxidant activity

2.5.1 Antioxidant activity using 2,2-azino-bis-(3 ethylbenzothiazoline)- 6-sulfonic acid (ABTS)

The oxidation reaction was prepared with 7 mM ABTS stock solution plus 140 mM potassium persulfate (final concentration) and the mixture was left in the dark at room temperature (23–25° C) for 12–16 h (time required for radical formation) before its use. The ABTS⁺ solution was diluted in ethanol to an absorbance of 0.7 (±0.02) units at 734 nm. The effect of OFCM amount on the antioxidant activity was carried out using aliquots of 30 µL, and mixing with 3 mL diluted ABTS⁺ solution. The absorbances at 734 nm were measured at different time intervals (6, 15, 30, 45, 60 and 120 min). Trolox (6-hydroxy-2,5,7,8-tetramethylchroman-2-carboxylic acid) was used as a reference standard. The values of oxidative inhibition percentage were calculated and plotted as a function of the reference antioxidant concentration (Trolox) and expressed as Trolox equivalent antioxidant capacity (TEAC, µM). All determinations were carried out in triplicate.

2.5.2 DPPH radical scavenging assay

DPPH free radical scavenging activity of the OFCM was determined according to the method of Brand-Williams et al. (1995), with a few modifications. In plate with 96 wells was added 0.04 ml of OFCM and 0.25 ml of the DPPH (6×10^{-5} mol/l). After 30 min at room temperature and in the dark, absorbance was measured at 517 nm. For the control was added 0.04 ml of methanol with 0.25 ml of DPPH solution. For the positive control was used 0.04 ml of quercetin or gallic acid in presence of the DPPH solution. The standards (quercetin and gallic acid) were at concentration at 1 mg/ml. DPPH free radical scavenging (FRS) activity was calculated according to the equation: $FRS (\%) = (Ac - As) / Ac \times 100$ where, Ac is the absorbance of the control and As is the absorbance of the sample.

2.5.3 Total antioxidant capacity (TAC)

The assay is based on the reduction of Molybdenum (VI) to Molybdenum (V) by the extract and subsequent formation of a green phosphate–Molybdenum (V) complex at acid pH (Prieto et al., 1999). An aliquot (0.1 ml) of OFCM was mixed with 1 ml of reagent (600 mM sulphuric acid, 28 mM sodium phosphate and 4 mM ammonium molybdate). After, the tubes were capped and incubated in a water bath at 95°C for 90 min. After cooling to room temperature, the absorbance of the samples was measured at 695 nm against a blank (1 ml of reagent and 0.1 ml of the solvent). Total antioxidant capacity was expressed in relation to ascorbic acid and gallic acid (1mg/ml) and calculated by the following formula: $TAC (\%) = (As - Ac) \times 100 / (Aaa - Ac)$ where: Ac = control absorbance; As = sample absorbance; Aaa = ascorbic acid absorbance.

2.6. Antimicrobial activity assay

2.6.1. Microorganisms

The following microorganisms were used: *Staphylococcus aureus* (ATCC6538), *Micrococcus luteus* (ATTC2225), *Bacillus subtilis* (16-UFPEDA) *Pseudomonas aeruginosa* (39-UFPEDA), *Mycobacterium smegmatis* (71-UFPEDA), *Enterococcus faecalis* (ATCC6057), *Escherichia coli* (ATCC25922), *Serratia sp* (398-UFPEDA), *Candida albicans* (1007-UFPEDA), *Staphylococcus aureus* (CI, 731-UFPEDA, wound Secretion-HC, ORSA), *Pseudomonas aeruginosa* (CI, 736-UFPEDA, wound Secretion-HC), *Enterobacter aerogenes* (CI, 739-UFPEDA, wound Secretion-HC). The microorganisms were provided by the Antibiotic Department at th Federal University of Pernambuco – UFPE - Brazil. They were maintained in culture medium bacterial Mueller-Hinton agar, nutrient agar, and glucose yeast agar which were prepared according to the manufacturer's instructions.

2.6.2 Determination of Minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC/MFC)

The MIC is considered as the lowest concentration of the sample which inhibits the visible growth of a microbe, to according to the Committee for Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI - 2006). The minimum inhibitory concentration (MIC) was determined by the

broth microdilution performed in 96-well sterile micro plates. Solution of OFCM (2 mg/ml) was prepared in dimethylsulphoxide (DMSO). The inoculum was prepared by direct saline suspension of isolated bacterial colonies. Suspension was adjusted to achieve a turbidity equivalent to 0.5 McFarland turbidity standards, which approximated 1.5×10^8 CFU/ml. All the wells received 100 μ l of Mueller Hinton broth (for bacteria) or glucose agar broth (for *C. albicans*). The first well of the microplate was the negative control (100 μ l of broth), the second was positive control (100 μ l of broth + 10 μ l of bacterial suspension) and the third well was added 80 μ l of broth more e 20 μ l of fodder palm mucilage solution, from this well the extract was successively diluted (serial dilution using a multichannel pipette) to the twelfth well getting 10 concentrations, ranging from 2 000, 1 000, 500, 250, 125, 62.5, 31.25, 15.62, 7.81 to 3.9 μ g/ml. One hundred microliter of the inoculum suspension was added to the wells. Each microplate was covered and incubated for 24 hours at 37 °C. All experiments were carried out in triplicate. For revelation of the results was utilized an indicator solution of sodium resazurin 0.01% (20 μ l). Reading the results to determine the MIC was considered as positive for the wells that kept the blue and negative staining those obtained red.

The MBC/MFC was determined by placing the sample by means of bacteriological loop, from each decoction concentration of the inoculum that MIC was positive. The reading was done after incubation of the plates at 37 °C for 24 hours, being considered MBC/MFC the plate which did not showed microbial growth.

2.6.3. Standard drugs used for antimicrobial assay

Amoxicillin, *erythromycin*, *ciprofloxacin* and *ketoconazole* were used as reference antibiotics against bacteria and yeasts, respectively. The drugs were used at the same concentrations of the extract (2 mg/ml).

2.7 Brine shrimp lethality test (BST) with *Artemia salina* Leach.

The determining the bioactivity of the OFCM using *A. salina* L., was performed according to Meyer et al. (1982) methodology. The brine shrimp eggs were incubated in a hatching chamber with sea water filtered at temperatures of 20–30 °C under aeration for 48 h. After hatching, active nauplii were separate, with the help of the Pasteur pipette, groups of 10 larvae per test tube containing 5 ml of sea water and checked for viability. For the control, thde test

tube containing the same volume of seawater was used and 10 living nauplii were also taken. Tested concentrations (in quadruplicate) were 12.5, 25, 50, 100, 125, 250, 500, 1000 µg/ml the fodder palm mucilage. Every test tube with sample contained 10 larvae (nauplii) of brine shrimp, including the control group. After 24 h of incubation, the tubes were observed using stereoscopic microscope and the number of surviving nauplii in each vial was counted and recorded.

The biological activity using the brine shrimp test was recorded as the concentration where 50% of the larvae were dead within 24 hours of contact with the extract: LC₅₀ below 249 µg/ml are considered highly toxic, 250-499 µg/ml as median toxicity and 500-1000 µg/ml as light toxicity. Values above 1000 µg/ml were regarded as non-toxic. (Bussmann et al., 2011).

2.8 Statistical analysis

Means were compared by Tukey test with $p < 0.05$. The median lethal concentration (LC₅₀) and 95% confidence intervals of the test samples were calculated using Probit analysis method described by Finney (1971), as the measure of toxicity of the mucilage.

3. Results

3.1. Total phenolic and flavonoid contents

The amount of total phenolics and flavonoids in the OFCM are summarised in Table 1. The total phenolic contents was 64.9 ± 0.6 µg GAE/ml of OFCM. The amount of total flavonoids assessed was 31.8 ± 0.4 µg QE/ml of OFCM. These results showed that the flavonoid content representing 50% of the total phenolics present in the *Opuntia ficus indica* mucilage.

Insert Table 1 here

3.2 Evaluation of OFCM antioxidant activity

3.2.1 Radical cation ABTS⁺ scavenging activity

As shown in Table 2, the *Opuntia ficus indica* mucilage present antioxidant activity as a function of time, with oxidative inhibition of $98.40 \pm 0.40\%$ after 120 min, equivalent to TEAC of 2173.30 ± 8.8 µM Trolox. In the first six minutes already showed percentage

inhibition of $65.93 \pm 2.70\%$ already, passing to $80.05 \pm 1.24\%$ after 15 minutes. Then it was gradually increasing, remaining practically constant, after 120 minutes when the increase was of approximately 100%.

Insert Table 2 here

3.2.2 DPPH radical-scavenging activity

The radical-scavenging activity of OFCM was tested using a methanolic solution of the “stable” free radical, 2,2 diphenyl-1- picrylhydrazyl (DPPH) and compared with gallic acid and quercetin used as standards. The analysis of Table 3 and Figure 1 showed that the free radical scavenging (FRS) activity of OFCM, gallic acid and quercetin calculated as inhibition percentage of the DPPH radical formation was: $64.03 \pm 7.8\%$, $89.37 \pm 3.5\%$ and $89.01 \pm 2.3\%$, respectively. Figure 1 show that the free radical-scavenging activity of OFCM appeared significantly ($p < 0.05$). These different values of inhibition percentage indicated that the order of increasing antioxidant potential of DPPH radical was OFCM < quercetin < gallic acid.

Insert Figure 1 here

3.2.3 Total antioxidant capacity

The total antioxidant capacity values expressed as mg ascorbic acid equivalent per ml of OFCM and as mg gallic acid equivalent per ml of OFCM were: $48.4 \pm 0.3\%$ and $67.2 \pm 0.4\%$, respectively, presented in Table 3. The OFCM presented the highest activity when expressed per equivalent gallic acid.

Insert Table 3 here

3.3 Evaluation of OFCM Antimicrobial activity

In the present study, the *in vitro* antimicrobial activity of *Opuntia ficus indica* mucilage against twelve microbial strains and their potential activity were quantitatively assessed by the MIC and MBC/MFC values. The mucilage of the investigated plant species showed *in vitro* antimicrobial activities against one or more bacterial strains and the yeast species tested. The antimicrobial activity of plant extract was compared with standard antibiotics such as

amoxicillin, erythromycin, ciprofloxacin and ketoconazole, which were used as positive controls. Results of the antimicrobial activity obtained is summarised in Table 4.

The data indicated that the mucilage displayed a variable degree of antimicrobial activity on different tested strains showing activity against gram-positive and gram-negative bacteria and the yeast tested. The inhibitory property of the extract was observed within a range of concentrations from 3.9 to 2000 µg/ml.

Gram- positive bacteria: the *Micrococcus luteus* strain (ATCC 2225) was sensitive to extract of *Opuntia ficus indica* with MIC of 1000 µg/ml and MBC of 2000 µg/ml. The *Mycobacterium smegmatis* (71-UFPEDA) with MIC of 500 µg/ml and MBC of 2000 µg/ml. Gram- negative bacteria: *Pseudomonas aeruginosa* (39-UFPEDA) and *Pseudomonas aeruginosa* (CI, 736-UFPEDA, wound Secretion-HC) both exhibited MIC of 2000 µg/ml and did not present MBC.

The mucilage was also active against yeast tested such as: *Candida albicans* yeast (1007-UFPEDA) which presented their growth inhibited with MIC: 1000 µg/ml and MFC of 2000 µg/ml.

Insert Table 4 here

3.4 The cytotoxicity assay (LC_{50}) using *Artemia salina*

The results of BST against the *Artemia salina* can be seen in Figure 2 showing a low toxicity of the *O. ficus indica* mucilage with LC_{50} of 584.11 µg/ml. The toxicity began to be significant at a concentration of 500 µg/ml. The concentrations of 500 µg/ml and 1000 µg/ml differ statistically compared to the control. It is relevant to note that concentrations below 500 µg/ml the extract haven't significant toxicity. The low toxicity can be considered an interesting characteristic to use of plant extracts for medicinal purposes and in the formulations of phytotherapies.

Insert Figure 2 here

4. Discussion

In this study was determined the phenolic composition and antioxidant and antibacterial activities of *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage, an exotic cactaceous found in a semi-arid region Northeast Brazil.

Plant that originates phenolics and flavonoids compounds have been reported as scavengers and inhibitors of lipid peroxidation (Gouthamchandra et al., 2010). The medicinal actions of natural products mentioned above are mostly credited to their antioxidant activity and free radicals scavenging ability.

The estimation of OFCM phenolics content was made using Folin–Ciocalteu method described by Li et al. (2008). The OFCM exhibited a high phenolics content ($64,9 \pm 0,6 \mu\text{g GAE/ml}$ of OFCM) when compared with the values 41.0, 56.7 and $22.5 \mu\text{mol GAE/g}$ of *O. ficus indica* cladodes varieties “Copena V1”, “Rojo vigor” and “Atlixco”, respectively, cultivated in Mexico (Astello-García et al., 2015). However, these values are much higher than those reported by Lee et al. (2002) ($21.75 \mu\text{mol GAE/g}$), while Santos-Zea et al. (2011) reported very low values ($1.87 \mu\text{mol GAE/g}$), that could be due to their method of sample preparation. It is well known that chemical composition of cladodes is modified by maturity stage, harvest season, environmental conditions, post-harvest treatment and type of species (Guevara-Figueroa et al., 2010).

The total flavonoids content detected in OFCM was determined based on the formation of flavonoid–aluminium complex (Lamaison et al., 1990). The amount of total flavonoids assessed was $31,8 \pm 0,4 \mu\text{g QE/ml}$ of OFCM, this content appears slightly higher than that the flavonoids content detected in *O. ficus indica* cladodes varieties “Copena V1”, “Rojo vigor” and “Atlixco” (17.6, 20.4 and $20.1 \mu\text{mol of QE/g}$) reported by Astello-García et al., 2015. Phytochemical analysis of *O. ficus indica* cladodes mucilage for flavonoids revealed the presence of quercetin, kaempferol, and taxifolin (Stintzing and Carle, 2005). Inal and Kahraman (2000) previously reported that quercetin proved a potential radical-scavenging activity, based on its ability to donate electrons from their hydroxide group. Hence, the amount of total phenolic and flavonoids contents detected in OFCM may attribute for this extract a potential antioxidant activity.

The increased level of reactive oxygen species (ROS) can damage the structure of biomolecules and modify their functions, leading to cell dysfunction and even to the cell death. The Brazilian rich flora and fauna led to the formation of organisms capable of

producing various molecules with antioxidant action and these natural substances can be an important strategy for control of various diseases (Mishra et al., 2012).

O. ficus indica cladodes mucilage proved to be a promising source of antioxidant compounds as shown in Table 2 and 3. Therefore, in this study, three methods were used to measure the antioxidant activities of OFCM: ABTS radical, DPPH radical scavenging assays and total antioxidant activity, compared to the positive controls antioxidants (trolox, ascorbic acid, gallic acid and quercetin).

The values of oxidative inhibition percentage the ABTS assay were expressed as trolox equivalent antioxidant capacity. As shown in Table 2, the radical-scavenging activity of OFCM correlated with increasing of time, where after 120 minutes the increase inhibition percentage was of approximately 100%. According to Cardador-Martínez et al. (2011) the cactus pear (*Opuntia* spp.) peel extracts cultivars Montesa and Cristalina showed TEAC of 529 μ M and 430 μ M, respectively after 6 min, while in this study the TEAC was much larger (1443 μ M).

The stable DPPH radical was used as a substrate to evaluate antioxidant activity of mucilage. As shown in Figure 1, the radical-scavenging activity of OFCM was correlated with the standards, then it can be suggested that this activity was closely related to the large phenolics content detected in OFCM. Phenolics compound was able to liberate an electron from their hydroxyl group and could scavenge DPPH radical (Park et al., 2004). In addition to phenolics compounds, flavonoids are also detected and could in part contribute to the OFCM radical-scavenging ability. Inal and Kahraman (2000) previously reported that flavonoids and polysaccharide compounds possess a radical-scavenging activity, respectively due to their electron and hydrogen donating ability. The OFCM inhibition percentage of the DPPH radical formation ($64.03 \pm 7.8\%$) it was lower when compared with gallic acid ($89.37 \pm 3.5\%$) and quercetin ($89.01 \pm 2.3\%$). According to Alimi et al. (2010) the percentage of inhibition of DPPH radical found in *O. ficus indica* f. inermis methanolic root extract was $78.01 \pm 4.11\%$, this result, slightly higher than the one found in this study. However, extract of *Opuntia humifusa* stems showed 35.5% for butanol fraction, 15.4% for water fraction, and 7.2% for hexane fraction (Jun et al., 2013). This study demonstrate that OFCM exhibited a significant ABTS and DPPH radical-scavenging activity and moderate total antioxidant capacity (TAC). This activities are probably due to phenolic and flavonoids contents, detected, or added to the effect of other unknown compounds.

Besides the health problems related to oxidative stress, there is a great concern of researchers with infectious diseases caused by microorganisms. Infectious diseases remain a major cause

of death worldwide. Antimicrobial resistance is a serious problem throughout the world, which is very important and need more search for new antimicrobial agents (Miranda et al., 2013).

Table 4 shows the antimicrobial activity of OFCM against twelve microbial strains (Gram-positive, Gram-negative bacteria and yeast). The extracts were subjected to the determination of MIC and MBC/MFC values. The OFCM presented the highest antimicrobial activity against *Mycobacterium smegmatis* with inhibitory effect in 500 µg/ml and bactericidal effect in 2000 µg/ml. Due to the fact that a rapidly growing organism, easily cultivatable on majority of laboratory culture media and share the same structure of the cell wall of *M. tuberculosis* and other Mycobacteria, *M. smegmatis* has been widely used in research as a model organism for laboratory manipulation mycobacterial species (Danilchanka et al., 2008). This study also showed activity against *Candida albicans* yeast (MIC= 1000 µg/ml and MFC= 2000 µg/ml), which is a type of diploid fungus that causes, due course some types of oral and vaginal infection in humans. Also, this fungus could be dangerous for patients whose health is already weakened, such as patients in an intensive care unit. Because of these factors, *Candida albicans* has aroused great interest of research in health and medicine (Rosenbach et al., 2010).

Pereira Souza et al. (2014) conducted a study with atomized extract of *O. ficus-indica* cladodes, which was not able to inhibit the bacterial growth of strains used: *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923) and *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853). This result differs from the present study, where the OFCM inhibited *P. aeruginosa* strain (39- UFPEDA and CI, 736- UFPEDA) with MIC: 2000 µg/ml, but corroborates about the lack of inhibiting the growth of *E. coli* and *S. aureus*. The lower activity of tested plants against Gram-negative bacteria could be attributed to the presence of an extra outer membrane in their cell wall acting as a barrier for substances including antibiotics (Zampini et al., 2009). The action of this plant species against bacteria used in this study may be associated with the content of phenolic compounds observed in this plant extract, inducing an effective response across the studied microorganisms.

Several biological assays have been developed in order to be used in the monitoring of plant extracts, among these, the toxicity on *Artemia salina*, which is a quick and convenient bioassay as prior monitoring of plant extracts. By using this method, it is possible to determine the 50% lethal concentration (LC₅₀) of active compounds and extracts in a saline environment. The test allows the assessment of general toxicity and hence is considered

essential as a preliminary bioassay in the study of compounds with potential biological activities.

The brine shrimp lethality test with *Artemia salina* Leach showed a low toxicity with LC_{50} of 584.11 $\mu\text{g/ml}$ of *O. ficus indica* mucilage, suggesting that it should be considered for further pharmacological studies. This result corroborates with the study by Bussmann et al. (2011) which showed an LC_{50} of 465 $\mu\text{g/ml}$ from *O. ficus indica* ethanol extract considered as median toxicity.

5. Conclusion

In this study, phenolic compounds, biological properties (antioxidant and antibacterial activities) and toxicity of OFCM were determined. The OFCM exhibited a significant ABTS and DPPH radical-scavenging activity and moderate total antioxidant capacity (TAC). The plant showed better antibacterial activity against Gram-positive bacteria and also showed activity against the yeast *Candida albicans*. These activities are probably due to phenolic compounds contents, detected, or added to the effect of other unknown compounds. The OFCM also demonstrated a light toxicity with LC_{50} of 584.11 $\mu\text{g/ml}$. From the results obtained it is possible to conclude that the studied plant is a potential source of bioactive compounds, being promising in studies aimed to obtaining new antimicrobials and natural antioxidants.

Acknowledgement

The authors acknowledge the support given by the Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Department of Biochemistry and Department of antibiotics at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest in this work.

References

- Alimi, H., Hfaiedh, N., Bouoni, Z., Hfaiedh, M., Sakly, M., Zourgui, L., Rhouma, K.B., 2010, Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus indica* f. inermis root extract in rats. *Phytomedicine* 17, 1120-1126.
- Alves, C.Q., David, J.M., David, J.P., Bahia, M.V., Aguiar, R.M., 2010, Métodos para determinação de atividade antioxidante *in vitro* em substratos orgânicos. *Química Nova* 33, 2202-2210.
- Astello-García, M.G., Cervantes, I., Nair, V., del Socorro Santos-Díaz, M., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., Cisneros-Zevallos, L., de la Rosa, A.P.B., 2015, Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. *Journal of Food Composition and Analysis*.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M., Berset, C., 1995, Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food Science and Technology* 28, 25-30.
- Bresolin, T.M.B., Cechinel Fliho, V., 2010. *Fármacos e medicamentos: uma abordagem multidisciplinar*. São Paulo: Santos 416-2010.
- Bussmann, R., Malca, G., Glenn, A., Sharon, D., Nilsen, B., Parris, B., Dubose, D., Ruiz, D., Saleda, J., Martinez, M., 2011, Toxicity of medicinal plants used in traditional medicine in Northern Peru. *Journal of Ethnopharmacology* 137, 121-140.
- Cardador-Martínez, A., Jiménez-Martínez, C., Sandoval, G., 2011, Revalorization of cactus pear (*Opuntia* spp.) wastes as a source of antioxidants. *Food Science and Technology (Campinas)* 31, 782-788.
- CLSI. Performance Standards for antimicrobial susceptibility testing. 2006. CLSI approved standard M100-S16, Clinical and Laboratory Standards Institute, Wayne, PA. 17 ed.
- Corrales-Garcia, J., Peña-Valdivia, C.B., Razo-Martínez, Y., Sánchez-Hernández, M., 2004, Acidity changes and pH-buffering capacity of nopalitos (*Opuntia* spp.). *Postharvest Biology and Technology* 32, 169-174.
- Danilchanka, O., Pavlenok, M., Niederweis, M., 2008, Role of porins for uptake of antibiotics by *Mycobacterium smegmatis*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 52, 3127-3134.
- De Leo, M., De Abreu, M.B., Pawlowska, A., Cioni, P., Braca, A., 2010, Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC–PDA–ESI–MS and GC/EIMS analyses. *Phytochemistry Letters* 3, 48-52.
- Doughari, J.H, El-Mahmood, A.M., Tyoyina, I. 2008, Antimicrobial activity of leaf extracts of *Senna obtusifolia* (L). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2, 7-13.
- Finney, D.J., 1947, Probit analysis; a statistical treatment of the sigmoid response curve.

Freitas, R.C., Azevedo, R.R.S., Souza, L.I.O., Rocha, T.J.M., Santos, A.F., 2014, Avaliação da atividade antimicrobiana e antioxidante das espécies *Plectranthus amboinicus* (Lour.) e *Mentha x villosa* (Huds.). *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 35, 113-118.

Gouthamchandra, K., Mahmood, R., Manjunatha, H., 2010, Free radical scavenging, antioxidant enzymes and wound healing activities of leaves extracts from *Clerodendrum infortunatum* L. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 30, 11-18.

Guevara-Figueroa, T., Jiménez-Islas, H., Reyes-Escogido, M.L., Mortensen, A.G., Laursen, B.B., Lin, L.-W., De León-Rodríguez, A., Fomsgaard, I.S., de la Rosa, A.P.B., 2010, Proximate composition, phenolic acids, and flavonoids characterization of commercial and wild nopal (*Opuntia* spp.). *Journal of Food Composition and Analysis* 23, 525-532.

Inal, M.E., Kahraman, A., 2000, The protective effect of flavonol quercetin against ultraviolet a induced oxidative stress in rats. *Toxicology* 154, 21-29.

Jun, H.-I., Cha, M.-N., Yang, E.-I., Choi, D.G., Kim, Y.-S., 2013, Physicochemical properties and antioxidant activity of Korean cactus (*Opuntia humifusa*) cladodes. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 54, 288-295.

Lamaison, J., Petitjen-Freytet, C., Carnat, A., 1990. Teneurs en acide rosmarinique, en dérivés hydroxycinnamiques totaux et activité antioxydante chez les apiacées, les borraginacées et les laminacées médicinales. In: *Annales Pharmaceutiques Françaises*, pp. 103-108.

Leal, A.J.B., Dantas, I.C., Chaves, T.P., Felismino, D.C., Vieira, K.V.M., 2011, Estudo fitoquímico antimicrobiano de *Ceiba Glaziovii Kuntze K. Schum.* *Revista de Biologia e Farmácia* 5, 73-77.

Lee, J.-C., Kim, H.-R., Kim, J., Jang, Y.-S., 2002, Antioxidant property of an ethanol extract of the stem of *Opuntia ficus-indica* var. saboten. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 50, 6490-6496.

Li, H.-B., Wong, C.-C., Cheng, K.-W., Chen, F., 2008, Antioxidant properties *in vitro* and total phenolic contents in methanol extracts from medicinal plants. *LWT-Food Science and Technology* 41, 385-390.

Meyer, B., Ferrigni, N., Putnam, J., Jacobsen, L., Nichols, D.j., McLaughlin, J., 1982, Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta Medica*, 31-34.

Miranda, G., Santana, G., Machado, B., Coelho, F., Carvalho, C., 2013, Atividade antibacteriana *in vitro* de quatro espécies vegetais em diferentes graduações alcoólicas. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais* 15, 104-111.

Mishra, K., Ojha, H., Chaudhury, N.K., 2012, Estimation of antiradical properties of antioxidants using DPPH assay: A critical review and results. *Food Chemistry* 130, 1036-1043.

Neves, J.M., Matos, C.M., Moutinho, C.G., Gomes, L.R., Teixeira, T., 2009. Atividade antioxidante e avaliação *in vitro* da citotoxicidade de extractos aquosos de folhas de *Mentha piperita*. *Revista da Faculdade de Ciências da Saúde* 6, 344-54.

Oliveira, E.A., Junqueira, S., Mascarenhas, R., 2011, Caracterização físico-química e nutricional do fruto da palma (*Opuntia ficus indica* L. mill) cultivada no sertão do sub-médio São Francisco. *Holos* 3, 113-119.

Panico, AM, V Cardile, F Garufi, C Puglia, F Bonina and G Ronsisvalle 2005. Protective effect of *Capparis spinosa* on chondrocytes. *Life Sciences* 77: 2479-2488.

Park, K.-Y., Jung, G.-O., Lee, K.-T., Choi, J., Choi, M.-Y., Kim, G.-T., Jung, H.-J., Park, H.-J., 2004, Antimutagenic activity of flavonoids from the heartwood of *Rhus verniciflua*. *Journal of Ethnopharmacology* 90, 73-79.

Pereira Souza, C.M., Silva Almeida, F., Veiga Junior, V.F., de Lima Damasceno, B.P.G., Dantas Medeiros, A.C., Pereira Santana, D., Alexsandro Silva, J., 2014, Characterization of atomized extract of *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. and assessment of its pharmaceutical potential. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 35.

Pinto, E.P.P., Amorozo, M.C.M., Furlan, A., 2006, Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica - Itacaré, BA, Brasil. *Acta Botanica Brasilica* 20, 751-762.

Ponzi, E.A.C., Oliveira, T.L., Moraes, I.A.F., Silva Junior, J.J., Gerbi, M.M., Souza, I.A., Psiottano, M.N.C., Xavier, H.S., 2010, Atividade antimicrobiana do extrato de *Momordica charantia* L. *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco Maxilo Facial* 10,89-94.

Prieto, P., Pineda, M., Aguilar, M., 1999, Spectrophotometric quantitation of antioxidant capacity through the formation of a phosphomolybdenum complex: specific application to the determination of vitamin E. *Analytical Biochemistry* 269, 337-341.

Radulovic, N.S., Blagojevic, P.D., Stojanovic-Radic, Z.Z., Stojanovic, N.M., 2013, Antimicrobial plant metabolites: structural diversity and mechanism of action. *Current Medicinal Chemistry* 20, 932-952.

Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., Rice-Evans, C., 1999, Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free Radical Biology and Medicine* 26, 1231-1237.

Rosenbach, A., Dignard, D., Pierce, J.V., Whiteway, M., Kumamoto, C.A., 2010, Adaptations of *Candida albicans* for growth in the mammalian intestinal tract. *Eukaryotic Cell* 9, 1075-1086.

Santos-Zea, L., Gutiérrez-Urbe, J.A., Serna-Saldivar, S.O., 2011, Comparative analyses of total phenols, antioxidant activity, and flavonol glycoside profile of cladode flours from different varieties of *Opuntia* spp. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 59, 7054-7061.

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

Uchôa, A.D.A., 2014, Perfil fitoquímico e avaliação da bioatividade: antioxidante e antimicrobiana de extratos de folhas da *Alternanthera brasiliana* (L.) Kuntze

(Amaranthaceae). Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Fisiologia). Universidade Federal de Pernambuco, Recife.

Zampini, I., Cuello, S., Alberto, M., Ordonez, R., D'Almeida, R., Solorzano, E., Isla, M., 2009, Antimicrobial activity of selected plant species from “the Argentine Puna” against sensitive and multi-resistant bacteria. *Journal of Ethnopharmacology* 124, 499-505.

Table legends

Table 1 Contents of total phenols and flavonoids in OFCM.

Table 2 Antioxidant activity of OFCM using ABTS⁺

Table 3 Percentage of antioxidant activity of OFCM by the method of DPPH and total antioxidant capacity.

Table 4 The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC/MFC) of OFCM and reference drugs tested on twelve microorganisms.

Figure legends

Figure 1 Antioxidant activity of OFCM measured by using DPPH radical-scavenging method. gallic acid (1 mg/ml) and Quercetin (1 mg/ml) which were used as positive control. Each date represents the average of triplicates of different simple analyzed.* significantly different $p < 0,05$.

Figure 2 Lethal cytotoxicity assay (LC₅₀) of OFCM against *Artemia salina*. (*) = showed statistically significant differences in relation to the control.

Table 1

Contents of total phenols and flavonoids in OFCM.

Sample	Content	
	Total phenols (μg GAE/ml extract)	Total flavonoids (μg QE/ml extract)
OFCM	64.9 ± 0.6	31.8 ± 0.4

Values are expressed as mean $\pm$ S.D of triplicate measurement.

OFCM, *Opuntia ficus indica* L. Mill. Cladodes mucilage.

GAE, gallic acid equivalents.

QE, quercetin equivalents.

Table 2
Antioxidant activity of OFCM using ABTS⁺

Time	% Inhibition	TEAC (μM Trolox)
6 min	65.93 ± 2.70 ^a	1443.30 ± 60.62 ^a
15 min	80.05 ± 1.24 ^b	1761.10 ± 27.94 ^b
30 min	89.43 ± 1.50 ^c	1972.20 ± 33.73 ^c
45 min	94.02 ± 0.48 ^d	2075.50 ± 10.72 ^d
60 min	95.13 ± 0.66 ^{de}	2100.00 ± 14.56 ^{de}
120 min	98.40 ± 0.40 ^e	2173.30 ± 8.80 ^e

Mean = SD. n = 3. TEAC = antioxidant activity equivalent to Trolox. Average data with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05).

Table 3

Percentage of antioxidant activity of OFCM by the method of DPPH and total antioxidant capacity.

Sample	FRS (%)	TAC (%)	
		AscAE	GAE
OFCM	64.03 ± 7.8 ^a	48.42 ± 0.3	67.2 ± 0.4
Gallic acid	89.37 ± 3.5 ^b	ND	ND
Quercetin	89.01 ± 2.3 ^c	ND	ND

Values are expressed as mean ± S.D of triplicate measurement. (FRS): DPPH free radical scavenging. (TAC): Total antioxidant capacity. AscAE: expressed as ascorbic acid equivalent. GAE: expressed as gallic acid equivalent. ND: not determined. Average data with different letters are significantly different by Tukey test (p<0.05).

Table 4

The minimum inhibitory concentration (MIC) and minimum bactericidal or fungicidal concentration (MBC/MFC) of OFCM and reference drugs tested on twelve microorganisms.

Microorganisms	<i>O. ficus indica</i> MIC/MBC or MFC (Concentration: µg/ml)	Drugs MIC/ MBC or MFC (Concentration: µg/ml)
<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC6538)	* / *	3.9 / 124 (amoxicillin)
<i>Micrococcus luteus</i> (ATTC 2225)	1000 / 2000	3.9 / 500 (erythromycin)
<i>Bacillus subtilis</i> (16-UFPEDA)	* / *	7.81 / 2000 (erythromycin)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (39-UFPEDA)	2000 / *	3.9 / 31.25 (ciprofloxacin)
<i>Mycobacterium smegmatis</i> (71-UFPEDA)	500 / 2000	31.2 / 250 (Amoxicillin)
<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC6057)	* / *	3.9 / 250 (Amoxicillin)
<i>Escherichia coli</i> (ATCC25922)	* / *	3.9 / 7,81 (ciprofloxacin)
<i>Serratia sp</i> (398-UFPEDA)	* / *	3.9 / 250 (ciprofloxacin)
<i>Candida albicans</i> (1007-UFPEDA)	1000 / 2000	3.9 / 62.5 (ketoconazole)
<i>Staphylococcus aureus</i> (CI, 731-UFPEDA, wound Secretion-HC, ORSA)	* / *	31.2 / 2000 (amoxicillin)
<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (CI, 736-UFPEDA, wound Secretion-HC)	2000 / *	31.2 / 2000 (ciprofloxacin)
<i>Enterobacter aerogenes</i> (CI, 739-UFPEDA, wound Secretion-HC)	* / *	3.9 / 125 (ciprofloxacin)

CI: Clinical isolates

HC: Hospital clinical

MIC: Minimum Inhibitory Concentration (µg/ml).

MBC/MFC: Minimum Bactericidal or Fungicidal Concentration (µg/ml).

(*) = Not MIC or MBC/MFC.

Figure 1

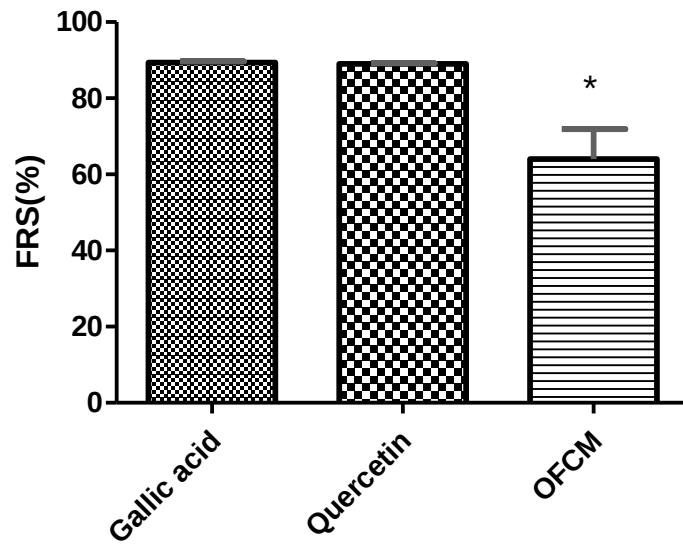
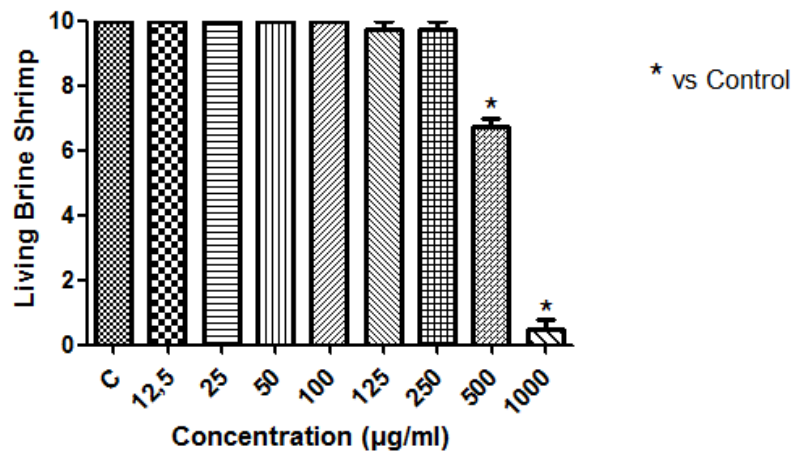


Figure 2



6. CAPÍTULO 2

Toxicological evaluation of mucilage from fodder palm (*Opuntia ficus indica* L. Mill) cladodes

C.S.Silva^{a,b}, A.D.A.Uchôa^b, A.R.Clark^a, M.H.M.L.Ribeiro^a, P.G.Cadena^c, M.C.B.Pimentel^{a,b}; M.P.C.Silva^{a,b*}

^a Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, S/N, 50670-901 Cidade Universitária, Recife-PE, Brasil.

^b Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 Recife-PE, Brasil.

^c Departamento de Morfologia e Fisiologia Animal (DMFA), Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE), Av. Dom Manoel de Medeiros, s/n, 52171-900, Dois Irmãos, Recife – PE, Brasil.

*Corresponding author

M.P.C.Silva, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rêgo, s/n, 50780-901 – Cidade Universitária, Recife –PE, Brasil.

Telephone number: +55 81 2126 8484; Fax number: +55 81 2126 8485

e-mail: mariadapazc@gmail.com.br

Abstract

The acute toxicity test estimates the median lethal dose (LD_{50}) and ranks as the dangerous toxicants, including plant extracts. The *Opuntia ficus indica* (Cactaceae), known as fodder palm, is popularly employed as antitumor, antiulcer, wound healing and antioxidant activity. Despite the use of this plant in folk medicine for several traditional communities, it is of great importance their toxicological study. Thus this study aims to evaluate the toxicity of the *O. ficus indica* cladodes mucilage (OFCM), administered by gavage, according to OECD 2001 for acute toxic dose test (*Guideline* 423) in male *Wistar* rats. The animals were divided into two groups (09 rats/group): control group that received distilled water and experimental group received 2000 mg/kg of OFCM. Clinical observations and individual physiological data (body weight, water and food consumption, feces and urine production) were conducted daily. Blood and urine were collected to measure changes. At necropsy, selected organs were weighed and recorded, and histological examination was performed. No deaths in the animals were observed during the 14 days experimental period. Differences in gain of weight, food and water consumptions, urine and feces productions, hematology, biochemistry, relative organ weight and histopathology examinations between the treated group and the control group were not considered as treatment-related because they showed no apparent dose dependent. From these results, it is possible to conclude that the LD_{50} of OFCM is higher than 2000 mg/kg in male *Wistar* rats, demonstrating reduced potential for acute toxicity.

Keywords: acute toxicity test; *Opuntia ficus indica*; *Wistar* rats; median lethal dose (LD_{50})

1. Introduction

Over the last two decades, the use of herbal remedies has expanded globally and traditional medicine has become very popular. According to the World Health Organization, about 80% of the world population, especially in developing countries, relies on plants for their health care (World Health Organization, 2008). This increasing growth in popularity is not only due to poverty and lack of access to the conventional medicine, but also to some untested assumptions such as drug resistance in several common diseases, undesirable side-effects of synthetic drugs and the general dissatisfaction of orthodox treatment (Ateba et al., 2014).

Many of the plants used in folk medications have been shown to be effective by the standards of modern science (Lahlou, 2007).

In addition, the belief that herbal drugs are safe and free from side effects because they are “natural” encourages the general public to adopt crude extracts for self-medication. However, there is a lack of data for many plants to guarantee their quality and safety (Markman, 2002). Currently the side effects of synthetic chemical drugs are an increasing concern in society; thus, there is growing interest in natural products, and scientific studies are being actively conducted on traditional herbal medicines (Shin et al., 2013).

Although shown biological activity of the herbal by communities, are made necessary largest studies of its toxic and medicinal activity, so that in this way, it is possible to design and develop new drugs produced through natural products as well, their consumption safely by population (Gonçalves, 2014).

Opuntia ficus indica (L.) Mill., commonly known in Brazil as “palma forrageira” or fodder palm (prickly pear or Indian fig in English), is a cactus native to arid Mexico, which has been disseminated in Central and South America as well as South Africa and throughout the Mediterranean region (De Leo et al., 2010). It is estimated in Northeast Brazil, approximately 500 000 cultivated hectares of this cactus (Oliveira, 2011).

The main constituents of the *O. ficus indica* cladodes are complex carbohydrates (eg, soluble fiber, cellulose, mucilage) (Trombetta et al., 2006) and the presence of uronic acid (Ribeiro et al., 2010). Also present in its composition glycoproteins (Schaffer and Nanney, 1996), aromatic compounds (particularly pigments as betacyanin and betaxantinas), polyphenols (in particular some flavonoids, such as quercetin, kaempferol, taxifolin (Stintzing and Carle, 2005). Still have some classes of lipids (fatty acids and sterols), glutathione, C and E vitamins, carotenoids (Panico et al., 2007) and minerals (Malainine et al., 2003). They are used in folk medicine for antiulcer, wound healing (Park and Chun, 2001), antitumorl (Zou et al., 2005) and antioxidant activities (Tesoriere et al., 2004).

Cladodes from *Opuntia ficus indica* are autochthonous Mexican foods, and are notable for their high calcium and fibre content (Ramírez-Moreno et al., 2013), in Brazil, in some municipalities of Bahia and at the Chapada Diamantina, the cladode participates of the population's diet (Chiacchio, 2008). According Ramírez-Moreno et al. (2015) the substitution of 6 % maize flour with dried cladodes increased soluble fibre and calcium contents, and improved calcium intestinal absorption (bioaccessibility 48 %). In general, *Opuntia* cladodes may be considered as a good source of fiber, and their consumption as a vegetable might also meet the daily dietary requirements of K, Ca, and Mn (Astello-García et al., 2015).

Despite the use of this plant in folk medicine for several traditional communities, regardless of pharmacological results, it is of great importance their toxicological study. Therefore this study aims to evaluate the toxicity of the *O. ficus indica* cladodes mucilage, according to the *Acute Toxic Class Method* (OECD 2001) for acute toxic dose test (*Guideline 423*) in male *Wistar* rats. The results of this study will provide an important reference for further clinical trials as a medication or usage as a food supplement for humans.

2. Materials and methods

2.1 Plant material and preparation of the mucilage

Opuntia ficus-indica (fodder palm) used to produce mucilage (tertiary and quaternary cladodes) was collected in April/2011, in the Experimental Station of the Agricultural Research Institute (IPA) of Caruaru city in the semiarid region of Pernambuco State in the Northeast of Brazil. The cladodes without thorns were washed in distilled water, cut in small pieces (about 5 cm) and crushed in industrial blender for 15 min and filtered in gauze. The supernatant was separated and called OFCM. To conduct the study mucilage was lyophilized.

2.2 Experimental animals and housing conditions

Wistar albinus rats (*Rattus norvegicus*), 18 males with 322.9 ± 37.6 g and 2 to 3 months of age from the Animals House of the Nutrition Department, Universidade Federal de Pernambuco, were used. The animals were transferred to the bioterium of the Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and kept in quarantine for one week at room temperature (22 ± 3 °C) and 12 h light/dark photoperiod, when it was performed ectoparasites control with bath Amitraz and endoparasites control with 4% Albendazole suspension in the drinking water, single dose, regardless the procedures performed in the bioterium origin. The animals were provided with standard laboratory diet (Labina[®]) and water *ad libitum* will. All procedures related to the use of animals as experimental models were performed according to the standards established by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA. The research project was submitted to the Ethics Committee of Animal Experimentation of the UFPE and approved under process number: 23076.036962/2012-61

2.3 Acute oral toxicity study in rats

2.3.1 Experimental design

This study is according to *Acute Toxic Class Method* (OECD, 2001) for acute toxic dose test (*Guideline 423*). OECD guide sets out 4 dose levels (5, 50, 300 and 2000 mg/kg). The initial dose selected from the fixed dose was the one most likely to produce mortality. In this experiment, the tests were started with the dose of 2000 mg/kg, because it is a plant extract already used by the population, occurring the death of 0-1 animal until the 14th day, the dose is repeated in three other animals. If more than one animal died, sequential administer smaller doses to enable the estimation of an LD₅₀ range according the Globally Harmonised System (GHS) standards, providing classification for toxicological class of the administered substance.

Prior to administration, animals were marked, fasted 12 h overnight (animals had water but not food) and weighed. The tests were performed in two groups with 09 rats each (realized in triplicate with 03 animals in each repetition): a control group (CG), receiving distilled water (1 ml) and the experimental group (GE) receiving the dose of 2000 mg/kg of OFCM (1ml) administered once by oral gavage. After dosing, food was withheld for a further 3–4 h and the animals were observed periodically during the first 24 hours after administering the mucilage and then once a day for 14 days, during this period the rats remained in metabolic cage. On 15 day, all the animals were weighed anesthetized (ketamine + xylazine association) the blood collected by cardiac puncture and euthanized subsequently intra-peritoneal administration of thiopental sodium (100 mg/kg). Their vital organs were observed individually and made the macroscopic and histopathological analyzes.

2.3.2 Evaluated parameters

2.3.2.1 Hippocratic screening

After dosing the animals were observed individually during the first 30 min, then 2, 4, 6 h after treatment, and thereafter daily for a total of 14 days. The five parameters of the hippocratic screening (Malone and Robichaud, 1962): conscious state (general activity); activity and coordination of motor system and muscle toning (response to tail touch and grip, straightening, strength to grab); reflexes (corneal and headset); activities on the central

nervous system (tremors, convulsions, straub, sedation, anesthesia and ataxia) and activities on the autonomic nervous system (lacrimation, cyanosis, ptosis, salivation and piloerection) were analyzed .

2.3.2.2 Physiological informations

Individual physiological data (body weight, water and food consumption, feces and urine production) were observed daily and recorded during the 14 day study. Animals were allowed access to food throughout the study without any limit.

2.3.2.3 Urine examination

During of the 14th day period, each rat was placed in a metabolic cage to collect urine, every 24 hours. Urine color was observed and urine volume was recorded. Urine pH, specific gravity (USG), glucose, protein, bilirubin, urobilinogen, ketones, nitrite, blood and leucocytes were analyzed by using a Uriscan[®] 11 strip (YD Diagnostics, Republic of Korea).

2.3.2.4 Hematology and serum biochemistry

Hematological and biochemical studies were determined using standard clinical procedures. After 12 h overnight fasting, the rats were anesthetized and blood samples were collected in two stages: before the oral administration of the OFCM (retro-orbital plexus puncture) and at the time of euthanasia via cardiac puncture.

Blood samples were collected in Vacutainers tubes containing anticoagulant ethylene diamine tetraacetic acid (EDTA) and hematological tests, which included White blood cell count (WBC), red blood cell count (RBC), Hemoglobin (HBG), hematocrit (HCT), mean corpuscular volume (MCV), mean corpuscular hemoglobin (MCH), mean corpuscular hemoglobin concentration (MCHC), platelet (PLT) count, lymphocytes (LYM), monocytes (MONO), Neutrophils (NEUT), eosinophils (EO) and basophils (BASO) were performed with an automatic cell counter (XT- 1800i, Sysmex, Japan).

For biochemical analysis, blood, without anticoagulant, was centrifuged at 3000 g for 10 min at 4 °C. Serum was separated and stored at 20 °C until analysis. glucose (GLU), total cholesterol (TC), high density lipoprotein (HDL), triglyceride (TG), Creatinine (CREA), Urea (URE), Uric acid (URI AC), total bilirubin (T-BIL), Direct bilirubin (D-BIL), Indirect

bilirubin (I-BIL), Alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST), alkaline phosphatase (ALP), Amylase (AMY), albumin (ALB), total protein (TP), Lactate dehydrogenase (LDH), Very low density lipoprotein (VLDL) and low density lipoprotein (LDL) were analyzed using an automatic chemical analyzer (Respons[®] 920, Diasys).

2.3.2.5 Macroscopic examination and organ weights

All rats were humanely sacrificed at the end of the test, and a complete necropsy was conducted on all animals. The criteria of gross pathological examination were based on the position, shape, size, color, and consistency of the organs. Gross lesions were examined from all animals in all groups. Some vital organs, including liver, kidneys and spleen, were removed and weighed. Paired organ was weighed together. The absolute organ weights were converted to relative organ weights based on the organ-to- body weight ratio. The mass calculation concerning organ of each animal was performed by dividing the weight of each body (g) the body weight of each animal on the collection day, and multiplying the result by 100. The result was expressed in g/100 g body weight.

2.3.2.6 Histopathological analysis

At the necropsy time, the following tissues and organs were collected for histopathological analysis from all animals in the vehicle control (distilled water) and 2000 mg/kg OFMC-treated groups: liver and kidneys. The organs were fixed in 10 % formalin, dehydrated in ethanol and clarified in xylene. After processing, the tissues were embedded in paraffin and then sectioned to a thickness of 5 µm and stained with hematoxylin and eosin (HE) for microscopic examination.

The tissues were examined under a microscope in a random order and blind to the original animal or group. The main purpose of the histopathologic examination was to evaluate the integrity of tissue excised organs, research with the main parameters as reversible cell damage (degeneration) and irreversible (necrosis and apoptosis), leukocyte infiltration, congestion, and fibrosis of blood extravasation.

2.3.3 Statistical analysis

Histological scores comparison between experimental and control groups (EG and CG) was performed by Mann Whitney U test. Significance was set at $p < 0.05$.

3. Results

3.1 Acute toxicity study

All the male rats in control group and OFCM-treated groups survived the 14-day observation period. The extract of OFMC did not cause mortality in any rats. During the acute experiment, no animals showed abnormal behavioral changes, being found by the hippocratic screening (Table 1), mild drowsiness or state of moderate consciousness during the first 1 hour, normalizing after 4 hours. Urine production was observed after 2 hs experiment. It can be observed that the feces production to zero was reduced in the first two hours, normalizing later. No sign of tremors, convulsion, straub and ataxia were observed in both groups (CG and EG). In general, animals from all treatment groups appeared healthy at the conclusion of the study period.

Insert Table 1 here

3.2 Physiological information

Figure 1 showed the mean body weights of male rats. Compared with the control group (distilled water), male rats of 2000 mg/kg OFMC treatment group did not present significant body weight gain during the 14 days. No significant differences in *Wistar* rats were observed among of the OFCM-treated group when compared with control group.

As shown in Table 2, male rats of 2000 mg/kg OFCM-treated group no significant differences in daily food and water consumptions and urine and feces productions compared with control group. However, there is a tendency of the control group (GC) animals show food intake and urine and feces productions medium per day, greater than EG (20.3 ± 5.8 g, 10.0 ± 4.7 ml and 11.5 ± 4.3 g, respectively). Another noticeable trend no statistically significant was the highest average daily consumption of water occurred in the animals that received the dose of 2000 mg/kg OFCM-treated (28.4 ± 10.7 ml).

Insert Figure 1 here

Insert Table 2 here

3.3 Urine examination

Urinary analysis did not reveal any significant changes in the male rats following the administration of OFCM at dose of 2000 mg/kg (data not shown). Although an increase in protein excretion and presence of a positive nitrite was noted in some of the treated rats (both CG and EG), these changes did not occur in a dose-dependent manner and were considered to be unrelated to the treatment.

3.4 Hematological analysis

Almost all the hematological results of the treated groups showed no significant differences with the control group (Table 3). The amount of platelets was the only hematological parameter that showed a significant difference compared before and after using of distilled water-control group (396.9 ± 268.7 and $782.8 \pm 346.0 \times 10^3/\mu\text{l}$, respectively). The other parameters the CG did not show statistically significant differences. The OFMC-treated group showed a significant decrease in total leukocytes and monocytes when compared to using before and after with the dose of 2000 mg/kg (11.7 ± 3.8 and $7.7 \pm 3.2 \times 10^3/\mu\text{l}$; 6.3 ± 1.4 and 4.8 ± 2.3 %, respectively).

Insert Table 3 here

3.5 Biochemical analysis

Serum biochemistry analysis data are shown in Tables 4. A significantly increase in blood glucose level was observed at the OFCM dose tested. Since an increase in blood glucose was also observed in the control group at the end of the 14-day experiment, this rule out a hyperglycaemic effect of the plant extract. In EG, the levels of CREA, URE and URI AC significantly decreased at the dose of 2000 mg/kg of OFCM, in CG, the levels of URE, URI AC, AST and LDH also was decreased with the use of distilled water after 14 days. In comparison to using before and after of OFCM and distilled water, the other serum biochemistry parameters were not changed significantly after the experiment period.

Insert Table 4 here

3.6 Macroscopic examination and relative organ weights

After 14 days of treatment with OFCM, gross examination of the vital organs (liver, kidneys and spleen) of all rats revealed no detectable abnormalities. Relative weights of the organs did

not have statistically significant difference between the animals treated with distilled water (CG) and OFCM-treated (EG) at the end of the experimental period (Table 5).

Insert Table 5 here

3.7 Histopathology

Histopathological examination of the organs (liver and kidneys) did not show any abnormal findings (Figure 2 and 3). Therefore, these results indicate that the oral administration of OFCM for 14 days did not have toxic effects on the rats.

Insert Figure 2 here

Insert Figure 3 here

4. Discussion

In the present study, acute toxicity of mucilage from *O. ficus indica* cladodes was performed in order to evaluate the safety of this widely used medicinal plant. OFCM was orally administered single at dose of 2000 mg/kg body weight to male *Wistar* rats. Mortality, clinical signs, and body weight changes were observed for 14 days after administration. No deaths in the animals were observed during the experimental period. No test substance-related effects were evident with regard to clinical signs, body weight changes, and necropsy findings in the two groups. Thus, according to the oral acute toxic class method used in this experiment (OECD, 2001) OFCM is classified in category 5 in the Globally Harmonized Classification (GHS) for chemical substances and mixtures as well as its LD₅₀ was estimated higher than 2000 mg/kg, hence considered as low toxicity.

Only in exceptional cases that there is justification for the use of the dose of 5000 mg/kg (OECD, 2001; BRAZIL, 2004). Even the 423 guide does not recommend the realization of the acute toxicity test using a dose of 5000 mg/kg, in order to protect the animal life and because of technical difficulties solubilization and administration, unless such a test is needed in a study to ensure the quality of human health. The cladodes from *Opuntia ficus indica* are already used by the population for many years, even to human food. For this reason, it was resolved, not to test the maximum dose, because is not an absolute necessity, making the very good results.

The hippocratic screening is a preview test used to verify and assess the pharmacotoxicological operation of the test substance (Cunha et al, 2009). The OFCM demonstrated

influence the overall activity and consciousness of the animals, which were quieter during the first hours of observation. The plant had no effect on motor coordination or reflexes, and does not influence other physiological activities related to central nervous system (such as tremors, convulsions, straub, hypnosis, anesthesia) or with autonomic nervous system (as lacrimation, breathing, cyanosis, ptosis, salivation, urination, defecation, hypothermia). The lack of agitation in the first hour can be related to satiety, normal physiological response of the animal to the administration of the plant by gavage.

Body weight change is often the first sign of toxicity, it is an important parameter for the evaluation of the substance effects on experimental animals (Liju et al., 2013). However, there were no significant changes in body weight in the OFCM-treated group compared with the control group throughout the study (Figure 1), as also the male rats exposed presented no significant differences in food and water consumptions, urine and feces productions compared daily with control group (Table 2). Thus it could suggest that at the acute oral administered did not present effect on the normal growth of rats.

The kidney and liver are major internal organs in the body that have several important functions (Worasuttayangkurn et al., 2012). To evaluate the symptoms of disorder in these organs, various hematological and biochemical parameters were assessed in male rats.

In hematology analyses, the changes observed in OFCM-treated group, including the significant decrease of the total leukocytes and monocytes when compared to using before and after the dose of 2000 mg/kg, were assumed to be toxicologically irrelevant because they were within normal physiological ranges (Harkness and Wagner, 1993; Cubas et al., 2007), and the alterations were very slight changes and not dose-related. According Ateba et al. (2014), flavonoids and quercetin, present in the tested extract, can induce the decrease of monocytes. The presence of these compounds might explain the decrease of monocytes observed after OFCM treatment. The increase amount of platelets was the only hematological parameter that showed a significant difference compared to using before and after of distilled water-control group. No statistical differences were observed for any of the other parameters (i.e. RBC, HGB, HCT, MCV, MCH, MCHC, NEUT, EOS, and BAS) examined in hematology analyses. Thus, the results suggested that OFCM had no effects on the circulating blood cells or on their production.

Clinical biochemistry determinations to investigate major toxic effects in tissues and, specifically, effects on kidney and liver, should be performed under certain circumstances may provide useful information. Some enzymes can be used as indicative of hepatocellular effects; the increases in the levels of AST, ALT and ALP in the serum are associated with

liver toxicity by drugs or any other hepatotoxin (Ramaiah, 2011). However, ALT is more specific to liver and thus a better parameter for detecting liver injury as AST is also associated with diseases of other organs such as heart and muscle (Ozer et al., 2008). ALP is an enzyme in the cells lining biliary ducts of the liver that has been used to diagnose biliary obstruction (Ozdil et al., 2010). In this study, acute exposure of rats to OFCM at dose of 2000 mg/kg, there was no significant change in the levels of AST, ALT and ALP. These suggest that the extract may haven't liver toxicity.

Besides, bilirubin is a breakdown product of hemoglobin and is associated with hepatic diseases like jaundice and ineffective erythropoiesis and increased bilirubin levels reflect the depth of jaundice (Thapa and Walia, 2007). In this study there wasn't significant change in the levels of serum bilirubin and albumin of both the treated and control rats. This suggests that the extract did not present toxic effect on the erythropoietic system as reported earlier in hematological parameters.

According to Mukinda and Eagles (2010) urea and creatinine are considered as important markers of kidney dysfunction. Urea, which is the end product of protein metabolism, is mostly synthesized in the liver. Lower-than-normal levels of urea may indicate impaired kidney function (Sireeratawong et al., 2008). The serum creatinine level is a good indicator of renal function since any elevation of serum levels is associated to a marked failure of nephrons function (Lameire et al., 2005). The data obtained in this study indicate a decrease in blood urea in the male rats treated with OFCM at doses of 2000 mg/kg. However, this reduction in urea levels did not greatly fluctuate from normal background levels, and the CREA levels also showed significantly decreased in the group treated with OFCM as well also to the control group. These suggest that the extract may have no liver toxicity.

On day 14, there was a significant increase in the mean glucose level of the treated and control rats. However, this result observed in both groups, can rule out a dose-related and hyperglycaemic effect of the plant extract. According to several studies (Fratimunaria et al, 1988; Yeh et al, 2003; Yang et al, 2008; Najm and Desiree, 2010 and Andrade-Cetto and Wiedenfeld, 2011) the *Opuntia cladodes* have been appreciated for its physiological benefits in glucose metabolism with hypoglycemic effects related.

In the evaluation of relative organ weight test, did not have statistically significant difference between the animals treated with distilled water (CG) and OFCM-treated (EG) at the end of the experimental period (14 days). The assessment of pathological changes in the organs of treated animals, both macro and microscopically, is the basis of a safety assessment (Prabu et al., 2013). In this study, the macroscopic analysis, the OFCM at dose of 2000 mg/kg, did not

produce any change in the treated animals' vital organs in the qualitative analysis. Similarly, in the histopathological analyses there were no findings suggestive of toxic effects (Figure 2 and 3). These results proved to be consistent with biochemical analyses, confirming the safety of using the OFCM.

5. Conclusion

In conclusion, the present investigation provides valuable information on the acute toxicity profile of oral use of mucilage from *O. ficus indica* cladodes. Based on the toxicological parameters evaluated in this current study, we conclude that OFCM did not induce mortality nor any toxicological signs in the main organs of rats analysed. The LD₅₀ for oral administration the OFCM was estimated to be greater than 2000 mg/kg can be classified into the Class 5 toxicity according to the GHS, being considered to have low toxicity.

6. Conflict of interest

The authors report no conflicts of interest in this work.

7. Acknowledgement

The authors acknowledge the support given by the Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Department of Biochemistry at the Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq).

8. References

- Andrade-Cetto, A., Wiedenfeld, H., 2011, Anti-hyperglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lem. Journal of ethnopharmacology 133, 940-943.
- Astello-García, M.G., Cervantes, I., Nair, V., del Socorro Santos-Díaz, M., Reyes-Agüero, A., Guéraud, F., Negre-Salvayre, A., Rossignol, M., Cisneros-Zevallos, L., de la Rosa, A.P.B., 2015, Chemical composition and phenolic compounds profile of cladodes from *Opuntia* spp. cultivars with different domestication gradient. Journal of Food Composition and Analysis.
- Ateba, S.B., Simo, R.V., Mbanya, J.C., Krenn, L., Njamen, D., 2014, Safety profile and gender specific differences of a methanol extract of *Eriosema laurentii* (Leguminosae)

- in acute and subchronic (28 days) oral toxicity studies in Wistar rats. *Food and Chemical Toxicology* 65, 27-32.
- Brazil, 2004. Resolução RE nº 90, de 16 de março de 2004. DOU 18/03/04. Guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Brasília: Agência Nacional de Vigilância Sanitária, 2004.
- Chiacchio, F.P.B., 2008, Incidência da cochonilha do carmim em palma forrageira. *Bahia Agrícola* 8, p12-14.
- Cubas, Z.S, Silva, J.C.R, Catão-Dias JL (ed.) 2007. Tratado de animais selvagens medicina veterinária. São Paulo: Roca. Seção 5: p.432-474.
- Cunha, L.C., Azeredo, F.S., Mendonca, A.C.V., Vieira, M.S., Pucci, L.L., Valadares, M.C., et al., 2009. Acute and subacute toxicity studies of the latex and of the ethanolic extract of the leaves of *Synadenium umbellatum* Pax in rats. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 19, 403–411.
- De Leo, M., De Abreu, M.B., Pawlowska, A., Cioni, P., Braca, A., 2010, Profiling the chemical content of *Opuntia ficus-indica* flowers by HPLC–PDA-ESI-MS and GC/EIMS analyses. *Phytochemistry Letters* 3, 48-52.
- Fрати-Munari, A. C., Gordillo, B. E., Altamirano, P., & Araiza, C. R. (1988). Hypoglycemic effect of *Opuntia streptacantha* Lemaire in NIDDM. *Diabetes Care*, 11, 63.
- Gonçalves, C.L., Bacteriostasia, citotoxicidade, atividade antioxidante e sinergismo com antibacterianos comerciais de plantas bioativas com indicativo medicinal. 2014, 92f. Dissertação (Mestrado em Ciências (Área do conhecimento: Sanidade Animal)-Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.
- Harkness SE, Wagner JE 1993. *Biologia e clínica de coelhos e roedores*. 3ed. São Paulo: Roca.
- Lahlou, M., 2007. Screening of natural products for drug discovery. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2 (5), 697–705.
- Lameire, N., Van Biesen, W., Vanholder, R., 2005. Acute renal failure. *Lancet* 365, 417–430.
- Liju, V.B., Jeena, K., Kuttan, R., 2013. Acute and subchronic toxicity as well as mutagenic evaluation of essential oil from turmeric (*Curcuma longa* L.). *Food Chemical Toxicology*. 53, 52–61.
- Malainine, M.E., Dufresne, A., Dupeyre, D., Mahrouz, M., Vuong, R., Vignon, M.R., 2003, Structure and morphology of cladodes and spines of *Opuntia ficus-indica*. Cellulose extraction and characterisation. *Carbohydrate Polymers* 51, 77-83.
- Malone, M. H.; Robichaud. R. C., 1962. A Hippocratic screening for pure or drug materials. *Lloydia*, v.25, p.23- 53.

- Markman, M., 2002. Safety issues in using complementary and alternative medicine. *Journal of Clinical Oncology* 20, 39–41.
- Mukinda, J.T, Eagles, F.K., 2010. Acute and sub-chronic oral toxicity profile of the aqueous extract of *Pohy gala fruticosa* in female mice and rats. *Journal of Ethnopharmacology*. 128, 236–240.
- Najm, W., Desiree, L., 2010. Herbals used for diabetes, obesity and metabolic syndrome. *Primare Care: Clinics in Office Practice* 37, 237–254.
- OECD, 2001. Guidelines for testing of chemicals: Acute oral toxicity-Acute toxic class method. Test No. 423, adopted 22nd March 1996, and revised method adopted 17th December 2001. OEDC, Paris.
- Oliveira, E.A., Junqueira, S., Mascarenhas, R., 2011, Caracterização físico-química e nutricional do Fruto da palma (*Opuntia ficus indica* L. Mill) cultivada no sertão do sub-médio São Francisco. *Holos* 3, 113-119.
- Ozdil, B., Kece, C., Cosar, A., Akkiz, H., Sandikci, M., 2010. Potential benefits of combined N-acetylcysteine and ciprofloxacin therapy in partial biliary obstruction. *Journal of Clinical Pharmacology*. 50 (12), 1414–1419.
- Ozer, J., Ratweb, M., Shawc, M., Bailey, W., Schomaker, S., 2008. The current state of serum biomarker of hepatotoxicity. *Toxicity* 245, 194–205.
- Panico, A., Cardile, V., Garufi, F., Puglia, C., Bonina, F., Ronsisvalle, S., 2007, Effect of hyaluronic acid and polysaccharides from *Opuntia ficus indica* (L.) cladodes on the metabolism of human chondrocyte cultures. *Journal of ethnopharmacology* 111, 315-321.
- Park, E.-H., Chun, M.-J., 2001, Wound healing activity of *Opuntia ficus-indica*. *Fitoterapia* 72, 165-167.
- Prabu, P.C., Panchapakesan, S., Raj, C.D., 2013. Acute and sub-acute oral toxicity assessment of the hydroalcoholic extract of *Withania somnifera* roots in *Wistar* rats. *Phytotherapy Research*. 27, 1169–1178.
- Ramaiah, S.K., 2011. Preclinical safety assessment. Current gaps, challenges and approaches in identifying translatable biomarkers of drug- induced liver damage. *Clinics in Laboratory Medicine*. 31, 161–172.
- Ramírez-Moreno, E., Cordoba-Diaz, M., de Cortes Sánchez-Mata, M., Marqués, C.D., Goni, I., 2015, The addition of cladodes (*Opuntia ficus indica* L. Miller) to instant maize flour improves physicochemical and nutritional properties of maize tortillas. *LWT-Food Science and Technology* 62, 675-681.
- Ramírez-Moreno, E., Córdoba-Díaz, D., de Cortes Sánchez-Mata, M., Díez-Marqués, C., Goñi, I., 2013, Effect of boiling on nutritional, antioxidant and physicochemical characteristics in cladodes (*Opuntia ficus indica*). *LWT-Food Science and Technology* 51, 296-302.

- Ribeiro, E.M.O., Silva, N.H., Lima Filho, J.L., Brito, J.Z., Silva, M.d.P.C., 2010, Study of carbohydrates present in the cladodes of *Opuntia ficus-indica* (fodder palm), according to age and season. *Food Science and Technology* (Campinas) 30, 933-939.
- Schaffer, C.J., Nanney, L.B., 1996, Cell biology of wound healing. *International Review of Cytology* 169, 151-183.
- Shin, S.H., Koo, K.H., Bae, J.S., Cha, S.B., Kang, I.S., Kang, M.S., Kim, H.S., Heo, H.S., Park, M.S., Gil, G.H., Lee, J.Y., Kim, K.H., Li, Y., Lee, H.K., Song, S.W., Choi, H.S., Kang, B.H., Kim, J.C., 2013. Single and 90-day repeated oral dose toxicity studies of fermented *Rhus verniciflua* stem bark extract in Sprague–Dawley rats. *Food Chemical Toxicology*. 55, 617–626.
- Sireeratawong, S., Lertprasertsuke, N., Srisawat, U., Thuppia, A., Ngamjariyawat, A., Suwanlikhid, N., Jaijoy, K., 2008. Acute and subchronic toxicity study of the water extract from root of *Sida rhombifolia* Linn. in rats. *Songklanakarin. Journal of Science and Technology*. 30 (6), 729–737.
- Stintzing, F.C., Carle, R., 2005, Cactus stems (*Opuntia* spp.): A review on their chemistry, technology, and uses. *Molecular Nutrition & Food Research* 49, 175-194.
- Thapa, B.R., Walia, A., 2007. Liver function test and their interpretation. *Indian Journal of Pediatrics*. 74, 663–671.
- Tesoriere, L., Fazzari, M., Allegra, M., Livrea, M., 2005, 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. *Journal of Agricultural and food Chemistry* 53, 7851-7855.
- Trombetta, D., Puglia, C., Perri, D., Licata, A., Pergolizzi, S., Lauriano, E., De Pasquale, A., Saija, A., Bonina, F., 2006, Effect of polysaccharides from *Opuntia ficus-indica* (L.) cladodes on the healing of dermal wounds in the rat. *Phytomedicine* 13, 352-358.
- Worasuttayangkurn, L., Watcharasit, P., Rangkadilok, N., Suntararuks, S., Khamkong, P., Satayavivad, J., 2012. Safety evaluation of longan seed extract: acute and repeated oral administration. *Food Chemical Toxicology*. 50 (11), 3949–3955.
- World Health Organization, 2008. Traditional medicine. Fact sheet 134, 2003–2005. Archived from the original on 2008-07-28.
- Yang, N., Zhao, M., Zhu, B., Yang, B., Chen, Ch., Cui, Ch., et al. 2008. Antidiabetic effects of polysaccharides from *Opuntia monacantha* cladode in normal and streptozotocin-induced diabetic rats. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 9, 570e574.
- Yeh, G.Y., Eisenberg, D.M., Kaptchuk, T.J., Phillips, R.S., 2003. Systematic review of herbs and dietary supplements for glycemic control in diabetes. *Diabetes Care* 26, 1277–1281.

Zou, D.-m., Brewer, M., Garcia, F., Feugang, J.M., Wang, J., Zang, R., Liu, H., Zou, C., 2005, Cactus pear: a natural product in cancer chemoprevention. *Nutrition Journal*, 4, 25.

Table legends

Table 1 Acute oral toxicity of *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage in Wistar rats.

Table 2 Water consumption, food intake and urine and feces production of rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage.

Table 3 Hematological parameters of rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage.

Table 4 Biochemical parameters of rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage.

Table 5 Relative organ weights of male rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage.

Figure legends

Figure 1 Mean body weight of male Wistar rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage for toxicological assessment. * $p < 0.05$ compared with the control group (distilled water). Values expressed as mean $\pm$ SD, $n = 9$ animals/ group.

Figure 2 (A and B) Photomicrograph of kidney section from experimental group (OFCM-treated) on day 14 of acute toxicity test showing apparently normal glomerulus (G) and renal tubules with tubular epithelial cells (arrow). HE (x100, x400, respectively). (C and D) Photomicrograph of kidney section from control group (distilled water) after 14 days also showing the glomerulus (G) and renal tubules with tubular epithelial cells (arrow). HE (x100, x400, respectively).

Figure 3 (A and B) Photomicrograph of liver section from experimental group (OFCM-treated) on day 14 of acute toxicity test showing tissue integrity and hepatocytes (h). HE (x100, x400, respectively). (C and D) Photomicrograph of liver section from control group (distilled water) after 14 days also showing tissue integrity and hepatocytes (h). HE (x100, x400, respectively).

Table 1

Acute oral toxicity of *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage in Wistar rats.

Group	Rat	Effects	
	Sex	Behavioral alterations/toxicity symptoms	Death/treated rat
CG (distilled water)	M	Piloerection, mild drowsiness or state of moderate consciousness during the first hour.	0/9
EG (2000 mg/kg)	M	Piloerection, mild drowsiness or state of moderate consciousness during the first hour, urine production (2 hs).	0/9

Parameters related to screening hippocratic. The *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage, dissolved in distilled water was administered as single oral doses to group with 09 rats (realized in triplicate with 03 animals in each repetition). The control received distilled water by gavage. All animals were carefully examined for adverse effects (behavioural alterations/toxicity symptoms) for 14 days. M: male. CG: Control Group. EG: Experimental Group.

Table 2

Water consumption, food intake and urine and feces production of rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage.

Groups	Parameters	U - value	p - value
Water consumption (mL)			
CG (distilled water)	26.9 ± 9.7	119	0.34583
EG (2000 mg/Kg)	28.4 ± 10.7		
Urine production (mL)			
CG (distilled water)	10.0 ± 4.7	116.5	0.40801
EG (2000 mg/Kg)	9.7± 4.4		
Food Intake (g)			
CG (distilled water)	20.3 ± 5.8	96	0.94504
EG (2000 mg/Kg)	19.4 ± 5.8		
Feces production (g)			
CG (distilled water)	11.5 ± 4.3	146	0.02890
EG (2000 mg/Kg)	9.5 ± 3.0		

The values are expressed as means ± SD (n = 9 animals/group). * Significant differences between control and experimental groups by Mann Whitney – U test. Significance was set at p<0.05

Table 3Hematological parameters of rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage.

Hematological parameters	CG (distilled water)				EG (2000 mg/Kg)			
	Before	after	U-Value	p-Value	before	after	U-Value	p-Value
RBC (10 ⁶ /ml)	8.6 ± 1.5	7.8 ± 1.8	51	0.37698	8.2 ± 2.8	8.7 ± 0.9	46	0.65884
HGB (g/dL)	14.3 ± 1.9	13.3 ± 3.1	50.5	0.40032	13.6 ± 4.8	14.6 ± 1.6	44	0.79055
HCT (%)	44.5 ± 6.6	41.2 ± 8.7	54	0.25100	41.5 ± 13.5	44.9 ± 4.3	40.5	1.00000
MCV (fl)	52.8 ± 3.3	53.0 ± 2.4	36	0.72366	51.4 ± 3.4	51.7 ± 1.8	31	0.42606
MCH (pg)	17.0 ± 0.9	17.0 ± 0.8	43	0.85975	16.0 ± 2.4	16.7 ± 0.6	39	0.92953
MCHC (g/dl)	32.3 ± 0.8	32.0 ± 1.3	46	0.65802	31.4 ± 5.7	32.4 ± 1.6	47.5	0.56539
PLT (10 ³ /μl)	396.9 ± 268.7*	782.8 ± 346.0*	15	0.02728	299.6 ± 366.8	813.0 ± 466.2	18	0.05206
WBC (10 ³ /μl)	9.9 ± 3.4	6.5 ± 3.7	60	0.09340	11.7 ± 3.8*	7.7 ± 3.2*	64	0.04226
NEUT (%)	18.7 ± 2.6	20.1 ± 4.4	31	0.42654	17.9 ± 5.8	20.9 ± 5.9	25	0.18510
LYM (%)	70.3 ± 6.4	70.7 ± 10.5	34	0.59548	73.6 ± 6.5	70.8 ± 7.6	50.5	0.40130
MONO (%)	6.3 ± 1.0	6.8 ± 7.0	56.5	0.17088	6.3 ± 1.4*	4.8 ± 2.3*	63.5	0.04672
EO (%)	4.6 ± 5.0	2.4 ± 2.1	51.5	0.35309	2.0 ± 1.2	3.6 ± 3.9	35.5	0.69095
BASO (%)	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.0	58.5	0.05880	0.1 ± 0.1	0.0 ± 0.1	57	0.11834

The values are expressed as means ± SD (n = 9 animals/group). * Significant differences between control and experimental groups by Mann Whitney – U test. Significance was set at p<0.05

Table 4

Biochemical parameters of rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage.

Biochemical parameters	CG (distilled water)				EG (2000 mg/Kg)			
	Before	after	U-Value	p-Value	before	after	U-Value	p-Value
GLU (mg/dL)	137.9 ± 29.4*	246.9 ± 89.0*	5	0.01128	171.0 ± 26.7*	246.4 ± 70.9*	7	0.02156
TC (mg/dL)	66.3 ± 13.0	67.0 ± 13.1	31	0.67972	62.2 ± 8.6	62.3 ± 9.0	26.5	1.00000
HDL (mg/dL)	52.1 ± 11.9	40.2 ± 10.4	41	0.11161	50.7 ± 11.8	39.5 ± 5.1	41	0.11161
TG (mg/dL)	64.4 ± 27.2	76.6 ± 26.8	19	0.37676	61.0 ± 31.3	62.4 ± 33.3	28	0.95301
CREA (mg/dL)	0.9 ± 0.4	1.4 ± 1.7	36	0.31647	1.1 ± 0.4*	0.5 ± 0.3*	50	0.00790
URE (mg/dl)	52.6 ± 7.6*	39.0 ± 5.2*	50	0.00801	56.0 ± 8.9*	39.5 ± 4.1*	54	0.00179
URI AC (mg/dL)	2.1 ± 0.7*	1.3 ± 0.4*	44.5	0.04494	2.5 ± 0.7*	1.8 ± 0.8*	44	0.05162
T-BIL (mg/dL)	0.16 ± 0.1	0.15 ± 0.1	29.5	0.81334	0.17 ± 0.1	0.13 ± 0.0	34	0.44202
D-BIL (mg/dL)	0.08 ± 0.0	0.05 ± 0.0	40.5	0.12178	0.06 ± 0.0	0.07 ± 0.0	17.5	0.28275
I-BIL (mg/dL)	0.08 ± 0.0	0.10 ± 0.0	19	0.36939	0.11 ± 0.1	0.06 ± 0.0	34	0.44037
ALT (U/L)	79.1 ± 14.0	70.2 ± 16.8	40	0.14071	83.9 ± 17.2	66.1 ± 13.6	42	0.08748
AST (U/L)	265.5 ± 65.5*	207.7 ± 43.6*	44	0.05162	216.1 ± 8.9	210.5 ± 32.3	26.5	0.64037
ALP (U/L)	233.1 ± 76.1	248.8 ± 162.8	29	0.85968	358.3 ± 87.0	352.8 ± 542.5	45	0.03917
AMY (U/L)	1471.8 ± 509.3	1677.2 ± 381.0	21	0.51687	1463.1 ± 615.0	1660.1 ± 255.0	26	0.95301
ALB (g/dL)	3.7 ± 0.1	3.9 ± 0.3	14.5	0.15693	3.7 ± 0.2	3.7 ± 0.2	30.5	0.72344
TP (g/dL)	7.9 ± 0.5	7.2 ± 1.5	38	0.21592	8.4 ± 0.4	7.8 ± 0.8	42	0.08748
LDH (U/L)	4179.5 ± 669.1*	2645.4 ± 1099.1*	47	0.02156	3182.6 ± 709.1	3077.9 ± 1186.4	28	0.95301
VLDL (mg/dL)	13.0 ± 5.4	15.6 ± 5.4	17.5	0.28755	12.3 ± 6.2	12.4 ± 6.7	28	0.95289
LDL (mg/dL)	5.0 ± 7.7	11.9 ± 5.8	14	0.13321	6.3 ± 7.0	10.8 ± 7.9	16.5	0.23309

The values are expressed as means ± SD (n = 9 animals/group). * Significant differences between control and experimental groups by Mann Whitney – U test. Significance was set at p<0.05

Table 5Relative organ weights of male rats treated orally with *Opuntia ficus indica* cladodes mucilage.

Groups	Value	U - value	p - value
Liver (%)			
CG (distilled water)	3.42 ± 0.30	27	0.17349
EG (2000 mg/Kg)	3.14 ± 0.19		
Kidneys (%)			
CG (distilled water)	0.80 ± 0.06	25	0.29795
EG (2000 mg/Kg)	0.78 ± 0.17		
Spleen (%)			
CG (distilled water)	0.30 ± 0.05	23	0.47117
EG (2000 mg/Kg)	0.28 ± 0.03		

The values are expressed as means ± SD (n = 9 animals/group). * Significant differences between control and experimental groups by Mann Whitney – U test. Significance was set at p<0.05

Figure 1.

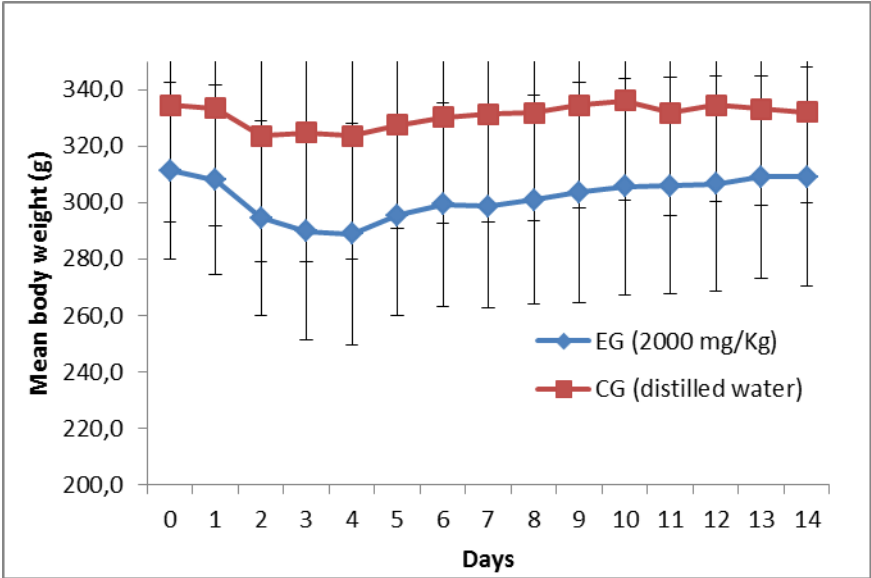


Figure 2.

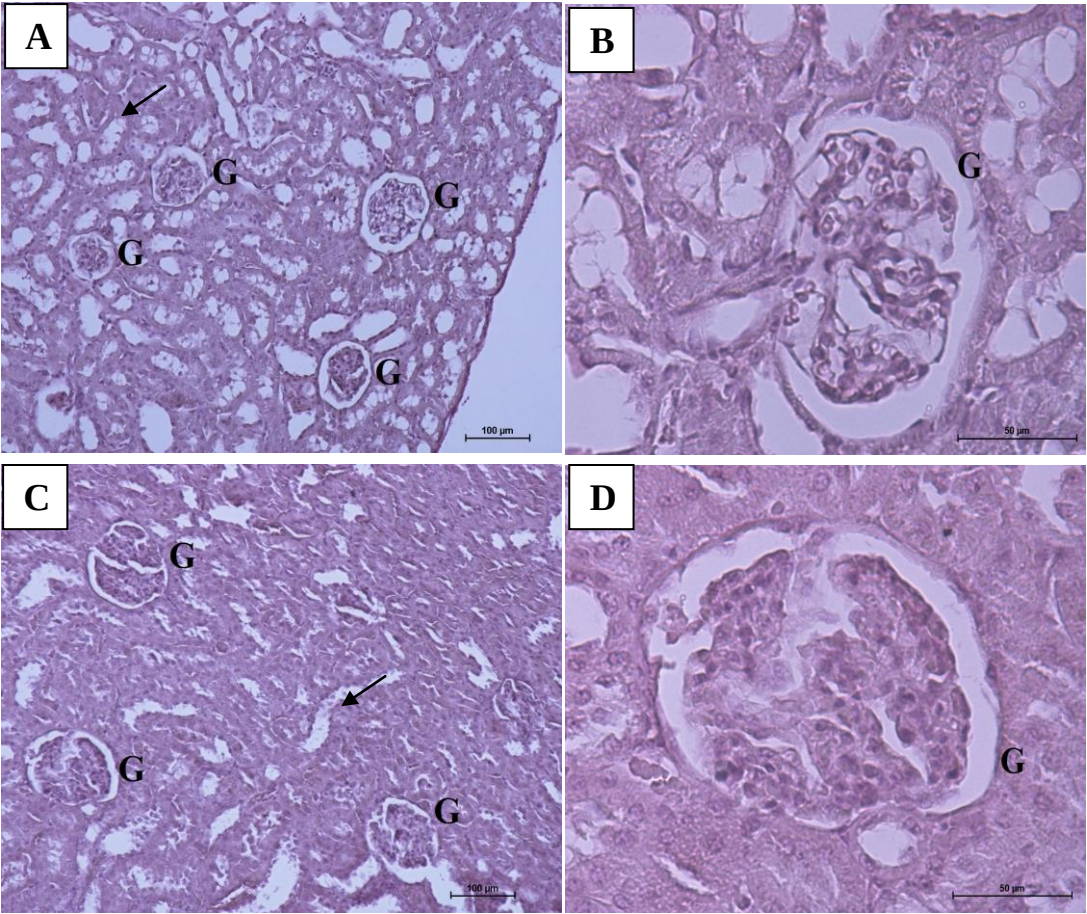
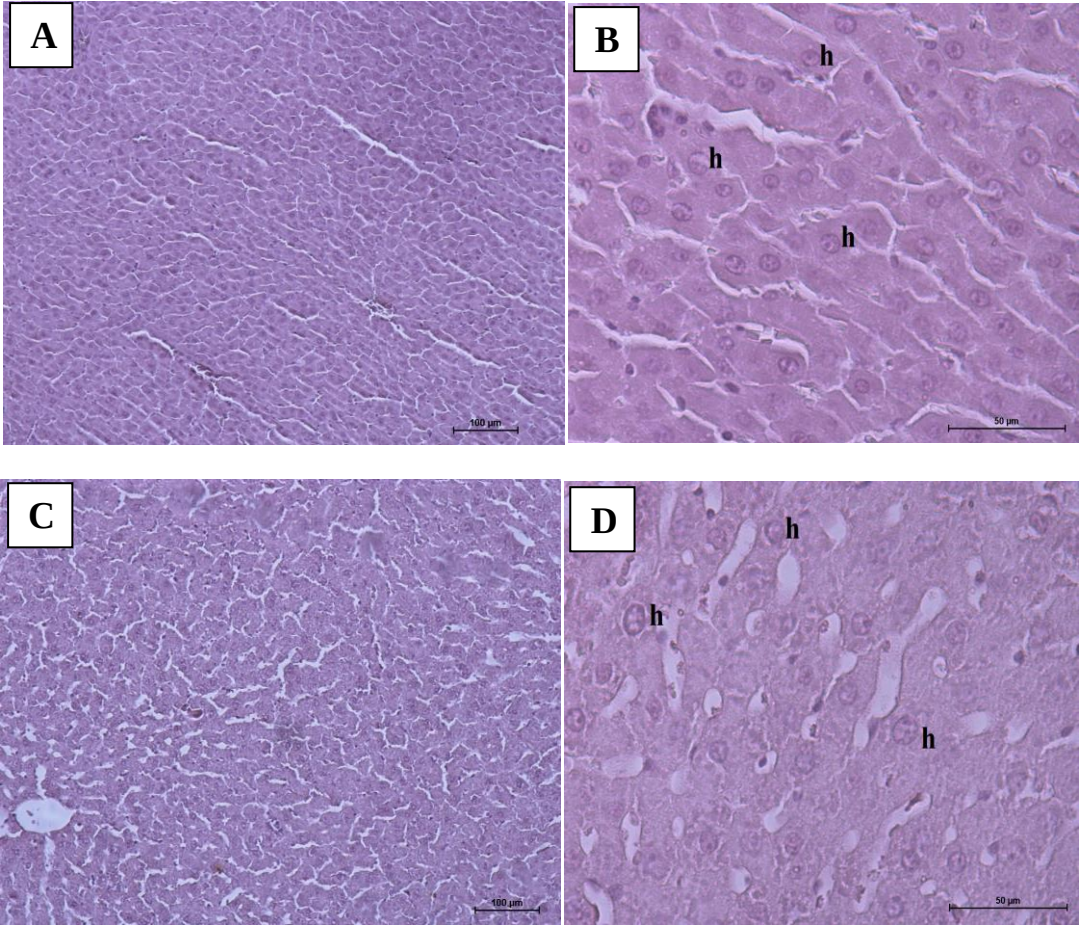


Figure 3.



7. CONCLUSÕES

- No presente trabalho a mucilagem a partir de cladódios de *Opuntia ficus indica* apresentou atividade antioxidante pelos métodos utilizados: ABTS, DPPH e capacidade antioxidante total, resultados estes, que ocorrem principalmente pela presença de compostos fenólicos (polifenóis, flavonoides) detectados nesta planta.
- A mucilagem de palma forrageira apresentou atividade antibacteriana contra bactérias gram-positivas (*Micrococcus luteus* e *Mycobacterium semegmatis*), gram-negativas (*Pseudomonas aeruginosa*- ATCC e de secreções de feridas) e levedura (*Candida albicans*), tornando esta planta uma opção para formulação de fármacos contra estes micro-organismos.
- O resultado da toxicidade letal usando *Artemia salina* mostrou uma CL_{50} de 584,11 $\mu\text{g/ml}$, sendo considerada de baixa toxicidade, o que sugere que esta planta pode ser utilizada para fins medicinais e nas formulações de fitoterápicos.
- Para determinação da toxicidade aguda foram utilizados ratos *Wistar* machos, que receberam por via oral a dose única de 2000 mg/kg da mucilagem de palma forrageira sendo avaliados por um período de 14 dias. Com base nos parâmetros toxicológicos estudados, conclui-se que a mucilagem não induziu mortalidade nem quaisquer sinais toxicológicos nos principais órgãos dos ratos. A DL_{50} foi estimada como sendo maior que 2000 mg/kg (Classe 5 de toxicidade, segundo o Globally Harmonized System – GHS), demonstrando reduzido potencial de toxicidade aguda.

8. PERSPECTIVAS

- A mucilagem de *Opuntia ficus indica* é uma potencial fonte de compostos bioativos, sendo promissores em estudos e visando à obtenção de novos agentes antimicrobianos e antioxidantes naturais com baixo efeito tóxico.
- Considerando-se a necessidade da busca de novos compostos de interesse medicinal e os promissores resultados mencionados pela sabedoria popular e pelo presente estudo, *O. fícus indica* mostrou ser uma espécie promissora e com grande potencial tecnológico.