

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel
Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

**Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e de características
fenológicas e físico-químicas da planta *Pereskia aculeata***

Débora Oliveira da Silva

Pelotas, 2017

Débora Oliveira da Silva

**Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e de características
fenológicas e físico-químicas da planta *Pereskia aculeata***

Tese apresentada ao Programa de Pós
Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos da Universidade Federal de
Pelotas como requisito parcial para
obtenção do grau de Doutora em
Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientador: Leonardo Nora

Coorientador: Nilesh Gaikwad

Pelotas, 2017

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

S586a Silva, Débora Oliveira da

Avaliaçãoda toxicidade, citotoxicidade e de características fenológicas e físico-químicas da planta *Pereskia aculeata* / Débora Oliveira da Silva ; Leonardo Nora, orientador ; Nilesch Gaikwad, coorientador. — Pelotas, 2017.

90 f. : il.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2017.

1. Ora-pro-nobis. 2. Barbados gooseberry. 3. Cactácea. 4. Toxicidade. I. Nora, Leonardo, orient. II. Gaikwad, Nilesch, coorient. III. Título.

CDD : 664

Débora Oliveira da Silva

Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e de características fenológicas e físico-químicas da planta *Pereskia aculeata*

Tese aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Doutor em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 17/02/2017

Banca examinadora:

Prof. PhD. Leonardo Nora (Orientador) Doutor em Biotecnologia de Plantas pela University of East Anglia

Profa. Dra. Letícia Mascarenhas Pereira Barbosa, Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Profa. Dra. Rejane Giacomelli Tavares, Doutora em Bioquímica pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Profa Dra. Elizabete Helbig, Doutora em Ciência e Tecnologia Agroindustrial pela Universidade Federal de Pelotas

Dr. Gabriel Ollé Dalmazo, Doutor Ciência e Tecnologia de Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

AGRADECIMENTOS

Como não poderia ser diferente, inicio agradecendo a Deus, pela dádiva da vida e por ser minha fonte de inspiração, força e fé.

Gratidão à minha família, por ser a minha base, meu porto seguro nessa caminhada terrena, em especial à minha mãe, por ser essa criatura tão iluminada, alegre e motivada, sempre com suas ideias geniais.

Agradeço ao meu marido, pela paciência nos meus momentos de estresse e pelo companheirismo de ter vindo morar comigo no Brasil.

Agradeço aos meus orientadores, primeiro, ao Prof. Leonardo Nora pelo apoio, tolerância, paciência e orientação. E também, ao Prof. Nilesh Gaikwad, por ter me recebido em seu laboratório na Universidade da Califórnia e ter me ensinado um pouco sobre química e cromatografia.

Gratidão aos meus amigos e colegas do DCTA, estagiários, mestrandos, doutorandos e pós doutorandos, que compartilharam comigo alguns momentos de tensão, espinhadas nas mãos durante as coletas da ora-pro-nobis e vários momentos de alegria. Sou também grata aos meus amigos anteriores ao DCTA, que nem mesmo a falta de tempo e depois a distância interferiram em nossa amizade.

Agradeço ao PPGCTA por ter me proporcionado realizar esse doutorado e com isso, me aprimorar profissionalmente. Bem como à FAPERGS e à CAPES pela concessão das bolsas de Doutorado e Doutorado Sanduiche.

Por último, a todos que de certa forma estiveram comigo me apoiando e incentivando em todos os momentos, obrigada!

RESUMO

SILVA, Débora Oliveira da. **Avaliação da toxicidade, citotoxicidade e de características fenológicas e físico-químicas da planta *Pereskia aculeata***. 2017. 91f. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

A planta *Pereskia aculeata* é uma hortaliça não convencional que possui grande potencial alimentar devido aos seus elevados teores de minerais, aminoácidos, vitaminas, fibras e antioxidantes. Entretanto, informações sobre características fenológicas, químicas e toxicológicas da planta, especialmente quando cultivada em região subtropical de clima temperado, são limitadas ou inexistentes. Assim, a planta *P. aculeata* foi cultivada sob clima temperado, em Pelotas, RS, Brasil, e avaliada quanto aos seguintes aspectos: (a) toxicidade aguda, (b) citotoxicidade, (c) características fenológicas e (d) características físico-químicas. A análise da toxicidade aguda foi realizada por meio de ensaio biológico, que utilizou 24 ratas, adultas, da linhagem *Wistar*. Os animais foram distribuídos em quatro grupos, de acordo com as doses administradas de extrato etanólico da planta *P. aculeata*: 0 mg/kg, 1250 mg/kg, 2500 mg/kg e 5000 mg/kg de massa corporal. O experimento teve duração de 15 dias e após a eutanásia foram realizadas avaliações histopatológicas em 8 órgãos. A citotoxicidade da *P. aculeata* foi avaliada utilizando-se alface (*L. sativa*) como modelo experimental. Sementes de alface foram tratadas com diferentes doses de extrato de *P. aculeata* (0,13 mg/ml; 1,30 mg/ml; 3,25 mg/ml; 6,50 mg/ml; 13,00 mg/ml) e avaliadas quanto ao índice de germinação, crescimento de raiz, crescimento de parte aérea, e índice mitótico. Durante 12 meses a planta foi avaliada periodicamente quanto a características físico-química (teor de umidade, área foliar, proteína, cor, fenóis totais e atividade antioxidante) e fenológicas (mudança foliar, floração e frutificação). Observou-se que *P. aculeata* não possui efeito tóxico em ratos, na dose de até 5000 mg/kg de massa corporal. A planta apresentou reduzido efeito citotóxico sobre alface, consistindo em alteração no crescimento de raízes e partes aéreas, porém sem comprometimento da germinação e sem efeito genotóxico na semente. No estudo fenológico observou-se boa adaptação da planta ao clima temperado, caracterizado pelo pleno crescimento e desenvolvimento. Entretanto, destaca-se um período de quiescência durante o inverno, no qual a planta não produziu folhas. Concluiu-se que o cultivo de *P. aculeata* é viável em clima temperado e que seu consumo alimentar é seguro.

Palavras-chave: Ora-pro-nobis; Barbados gooseberry; cactácea; toxicidade.

ABSTRACT

SILVA, Débora Oliveira da. **Toxicity, cytotoxicity, phenological, and physicochemical evaluations of *Pereskia aculeata* plant.** 2017. 91p. Thesis (Doctorate in Food Science and Technology) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2017.

The *Pereskia aculeata* plant has valuable nutritional properties and could be a supplementary food source, because it contains high amounts of minerals, amino acids, vitamins, fibers and antioxidants. However, we have limited information about toxicity, cytotoxicity, phenological and physicochemical characteristics of this plant, particularly when cultivated in subtropical areas with temperate climate. Thus, we analyzed *Pereskia aculeata* plants cultivated in Pelotas, RS, Brazil, under temperate climate, for: (a) acute toxicity, (b) cytotoxicity, (c) phenological characteristics and (d) physicochemical properties. The acute toxicity experiment was performed with 24 female *Wistar* rats. The animals were divided into four groups, according to the single dose of ethanolic plant extract they received: 0 mg/kg, 1250 mg/kg, 2500 mg/kg e 5000 mg/kg of body weight. After a 15 days period of observation the euthanasia was performed and 8 different animal tissues were sampled for histopathological analysis. The cytotoxicity was evaluated using lettuce (*L. sativa*) as an experimental model. The lettuce seeds were treated with different doses of *P. aculeata* extract (0.13 mg/ml; 1.30 mg/ml; 3.25 mg/ml; 6.50 mg/ml; 13.00 mg/ml) and analyzed for germination and mitotic indexes, and also for roots and shoots length. During 12 months cultivation period the plant was analyzed for physicochemical properties (humidity, color, leaf area, protein content, antioxidant activity, total phenolic content) and phenological aspects (leaf changes, flowering and fructification). Our results for acute toxicity of *Pereskia aculeata* show that it has non-toxic effect to rats at concentrations of 5000 mg/kg of body weight. We also found this plant to have minimal deleterious cytotoxicity effects on lettuce, consisting of abnormal growth of roots and shoots, but without affecting germination or causing genotoxic effect on lettuce seeds. Furthermore, *Pereskia aculeata* showed a good adaptation under temperate climate, with normal growth and development. Though, a quiescent state happened in the winter and the plant did not produce leaves. We conclude that cultivation of *Pereskia aculeata* under temperate climate is feasible and also, the leaves of these plants are safe for consumption as food.

Key words: Ora-pro-nobis; Barbados gooseberry; Cactaceae; toxicity.

SUMÁRIO

1	Introdução	9
1.1	Justificativa	10
1.2	Hipótese	10
1.3	Objetivos	11
1.3.1	Objetivo Geral	11
1.3.2	Objetivos Específicos	11
2	Revisão Bibliográfica	12
2.1	Plantas Comestíveis Não Convencionais	12
2.2	<i>Pereskia aculeata</i>	13
2.3	Toxicidade	16
2.4	Citotoxicidade	17
2.5	Esteroides	18
2.6	Métodos de Identificação de compostos	19
3	Projeto de Pesquisa	21
3.1	Introdução	21
3.2	Justificativa	23
3.3	Hipótese	23
3.4	Objetivos	23
3.4.1	Geral	23
3.4.2	Específicos	23
3.5	Materiais e Métodos	23
3.5.1	Material Experimental	23
3.5.2	Amostragem	24
3.5.3	Caracterização Fenológica	24
3.5.4	Cor	24
3.5.5	Área Foliar	24
3.5.6	Atividade antioxidante	24
3.5.7	Fenóis Totais	25
3.5.8	Vitamina C	25
3.5.9	Proteína	25

3.5.10 Umidade	25
3.5.11 Determinação da atividade antioxidante in vivo	26
3.5.12 Determinação da atividade antimicrobiana	26
3.5.13 Toxicidade Crônica	26
3.6 Cronograma	27
3.7 Referências	27
4 Relatório do Trabalho de Campo	30
4.1 Principais Resultados	30
4.2 Principais Publicações	31
4.3 Cronograma de atividades	32
5 Artigo 1	33
6 Artigo 2	56
7 Considerações Finais	70
Referências	71
Apêndices	83

1 Introdução

O cultivo e consumo de hortaliças têm diminuído em diversas regiões do país. No que tange a hortaliças não convencionais, cultivadas em determinadas localidades e que exercem influência na alimentação e na cultura de populações tradicionais, esse decréscimo é ainda mais acentuado (BRASIL, 2010). As hortaliças não convencionais fazem parte do grupo de Plantas Alimentícias Não Convencionais (PANC) e frequentemente são consideradas como plantas invasoras ou daninhas, entretanto, principalmente em função de mudanças climáticas que afetam os cultivos agrícolas convencionais, estas plantas vem sendo caracterizadas pela sua importância ecológica e econômica (KINUPP, 2007).

Dentre as hortaliças não convencionais pode-se destacar a taioba, ora-pro-nobis, serralha e mostarda; consumidas por algumas comunidades, tanto rurais quanto urbanas, por contribuírem para complementar a alimentação, inclusive com redução de custos e aprimoramento da economia familiar (ALMEIDA e CORREA, 2012).

A *Pereskia aculeata* Miller (*P. aculeata*), conhecida no Brasil como Ora-Pro-Nobis (OPN), pertence à família das cactáceas e se distribui desde o Sul do Brasil até o Sudeste dos Estados Unidos. É uma planta bastante resistente à déficit hídrico e possui grande potencial de utilização como complemento alimentar de populações carentes do Brasil e de outras partes do mundo (BRASIL, 2010; TAKEITI et al., 2009).

Em estudo realizado para determinar o teor de luteína (principal antioxidante presente nas membranas oculares, retina e mácula) em hortaliças, verificou-se altos teores desse carotenoide nas folhas de *P. aculeata* (NACHTIGALL et al., 2007). Takeiti et al. (2009), estudando a composição química de OPN, concluiu que a planta pode ser considerada uma boa fonte de minerais, vitaminas e aminoácidos. Já Valente et al. (2007), avaliando espécies brasileiras da família cactácea, concluiu que o extrato aquoso de OPN possui promissora atividade antitumoral e tripanocida. Pinto et al. (2012), evidenciaram que o extrato metanólico de OPN continha esteroides, fenóis,

flavonoides e taninos; e que os compostos fenólicos eram os componentes que apresentavam maior atividade antioxidante na planta.

Almeida et al. (2014), estudando a presença de substâncias antinutricionais em folhas desidratadas de OPN, identificou ácido oxálico, nitratos, saponinas e inibidores da tripsina. Segundo a autora, ainda que esses compostos antinutricionais estejam presentes, não há evidências de danos à saúde dos consumidores, provavelmente em função da reduzida concentração dos mesmos. Trabalho realizado por Doetsch et al. (1980), consistindo na identificação de alcaloides em 12 espécies de cactáceas, encontrou nas folhas de OPN o alcaloide tiramina. Já Pinto et al. (2015 a) identificou os alcaloides triptamina, mescalina e hordenina. Silva (2012) estudando a utilização das folhas de ora-pro-nobis na alimentação de ratos *Wistar* em fase de crescimento, substituindo parte da fonte proteica, na forma de caseína, pela planta desidratada e moída, verificou déficit no crescimento e prejuízo no reflexo desses animais.

1.1 Justificativa

A planta *P. aculeata* apresenta grande potencial como opção alimentar frente aos desafios na produção agrícola decorrentes de mudanças climáticas. Além disso, quando comparada a verduras tradicionais destaca-se favoravelmente, especialmente quanto ao perfil de aminoácidos, minerais e vitaminas. Entretanto, a inocuidade à saúde do consumidor ainda carece de avaliação, bem como a adaptabilidade para cultivo em regiões com clima temperado.

1.2 Hipótese

A utilização de extrato de *P. aculeata* não oferece riscos à saúde e o cultivo da planta pode ser realizado em regiões de clima temperado.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo Geral

Avaliar o potencial da planta *P. aculeata* como uma alternativa para hortaliças folhosas convencionais em região de clima temperado.

1.3.2 Objetivos Específicos

- ❖ Avaliar, através de ensaio biológico, a toxicidade aguda da planta *P. aculeata*;
- ❖ Avaliar o efeito citotóxico da *P. aculeata* em sementes de alface;
- ❖ Descrever as principais características físico-químicas e fenológicas da planta *P. aculeata* ao longo do seu cultivo em região de clima temperado;
- ❖ Analisar a concentração de esteroides em ratos tratados com a planta *P. aculeata*;
- ❖ Identificar componentes químicos majoritários da planta *P. aculeata*.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Plantas alimentícias não convencionais

As plantas alimentícias não convencionais (PANC), muitas vezes inconvenientes e denominadas daninhas, pragas, inços, invasoras são espécies relevantes frente aos problemas climáticos que afetam a produção de plantas alimentícias convencionais, e contribuem para a diversificação de cultivos agrícolas e viabilização econômica de pequenas propriedades. Dentre as PANC destacam-se as hortaliças não-convencionais (HONC), que possuem distribuição limitada, restrita a determinadas localidades ou regiões (KINUPP, 2007; BRASIL, 2010).

O cultivo das HONC no Brasil é feito predominantemente por pequenos agricultores para consumo familiar, por razões culturais e de tradição, sem estruturação comercial e portanto não despertando o interesse comercial de empresas de sementes, fertilizantes, agroquímicos e de alimentos. Neste contexto, percebe-se ainda, a grande falta de informações sobre cultivo e utilização das HONC, principalmente pela carência de estudos e divulgação do conhecimento sobre essas plantas, o que poderá acarretar em perda de genótipos (BRASIL, 2010).

Acredita-se que incentivos à produção e consumo das HONC pode resultar em importantes ganhos culturais, econômicos, sociais e nutricionais, já que as HONC geralmente apresentam teores de minerais e proteínas significativamente maiores do que as hortaliças convencionais, além de serem ricas em fibras e compostos com funções antioxidantes (KINUPP e BARROS, 2008).

Dentre as HONC destaca-se a *Pereskia aculeata* pelas excelentes características nutricionais e funcionais. Entretanto, ainda que utilizada tradicionalmente na alimentação humana, pouco é conhecido sobre a inocuidade dessa planta (SOUZA et al., 2009).

Para maior valorização das PANC de uso popular são necessários conhecimentos sobre seu cultivo e utilização. Trata-se de uma questão de

segurança e soberania alimentar estimular a produção e o consumo de PANC, principalmente considerando suas características nutraceuticas e rusticidade de cultivo (BRASIL, 2010).

2.2 *Pereskia aculeata*

A *Pereskia aculeata* Miller é uma PANC, da família das cactáceas, no Brasil é conhecida como “ora-pro-nobis” (OPN) e em alguns países Latino Americanos, como “Barbados gooseberry” (PEREIRA et al. 2007). Sua distribuição ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o sul do Brasil (TAKEITI et al., 2009). É uma planta perene, com características de trepadeira, mas pode crescer sem a presença de anteparo, com folhas suculentas e lanceoladas (Figura 1 A). As flores são pequenas e brancas (Figura 1 B). Os frutos são pequenas bagas amarelas (Figura 1 C). No caule há a presença de acúleos (falsos espinhos), que nos ramos mais velhos crescem aglomerados (BRASIL, 2010).



Figura 1. Imagens da planta *Pereskia aculeata*. (A) Folhas. (B) Flores. (C) Fruto.

A ora-pro-nobis possui folhas suculentas e comestíveis, podendo ser usadas em várias preparações, como farinhas, saladas, refogados, pães, tortas e massas alimentícias (ROCHA et al., 2008). Além da alimentação, a planta pode ser utilizada como ornamental e cultivada para fins de produção de mel, pois apresenta floração rica em pólen e néctar (BRASIL, 2010). Na medicina popular essa planta também é utilizada como anti-inflamatório, emoliente, expectorante e antissifilítico (SARTOR et al., 2010).

A concentração, expresso em massa seca, de proteínas ($28,4 \text{ g.100g}^{-1}$) e de triptofano ($5,52 \text{ g.100g}^{-1}$) nas folhas de OPN é elevada quando comparada a alimentos como o arroz e feijão, com $7,6 \text{ g.100g}^{-1}$ e $18,2 \text{ g.100g}^{-1}$ de proteínas e $0,84 \text{ g.100g}^{-1}$ e $0,27 \text{ g.100g}^{-1}$ de triptofano, respectivamente. Nutricionalmente o consumo desse aminoácido é essencial para síntese de serotonina, hormônio regulador do sono e do humor (SOUZA et al., 1991; WRIGHT et al., 2002; TAKEITI et al., 2009).

Ainda, ressalta-se o elevado conteúdo de minerais, principalmente, ferro ($14,2 \text{ mg.100g}^{-1}$ de massa fresca), cálcio ($3420 \text{ mg.100g}^{-1}$ de massa fresca) e zinco ($26,7 \text{ mg.100g}^{-1}$ de massa fresca). O conteúdo de ferro presente na OPN é 4 vezes maior do que no espinafre, vegetal conhecido pelo elevado teor desse mineral. Já o cálcio, presente em 100 g de folhas frescas de OPN é 27 vezes maior do que o conteúdo em 100 mL de leite. Em relação ao Zinco, 100 g de folhas frescas de OPN fornecem três vezes mais desse nutriente do que 100 g de carne bovina. Entretanto, cabe salientar que a biodisponibilidade desses nutrientes na *P. aculeata* carece de avaliação (TACO, 2006; TAKEITI et al., 2009).

Além disso, as folhas de OPN apresentam elevadas concentrações de vitaminas, com destaque para a vitamina C ($185,8 \text{ mg.100g}^{-1}$ de massa fresca) e ácido fólico ($19,3 \text{ mg.100g}^{-1}$ de massa fresca). Ou seja, 50g de folhas de OPN são suficientes para suprir as necessidades diárias de um adulto de ambas as vitaminas (TAKEITI et al., 2009; USDA, 2015).

Souza (2014 a) estudando o perfil de compostos fenólicos em folhas de OPN de quatro diferentes localidades do Brasil encontrou valores entre 58,37 e $81,29 \text{ mg.100g}^{-1}$ para o ácido clorogênico, 3,72 e $15,64 \text{ mg.100g}^{-1}$ para o ácido

caféico, 4,68 e 5,39 mg.100g⁻¹ para o ácido p-coumárico e 3,72 e 5,15 mg.100g⁻¹ para o ácido ferúlico. Já o somatório de compostos fenólicos variou entre 13,59 e 106,04 mg.100g⁻¹.

Pinto et al. (2012), evidenciaram a presença de esteroides, fenóis, flavonoides, taninos e alcaloides em extrato metanólico de *P. aculeata*. Além disso, identificaram, pelo método de cromatografia de camada delgada, que os compostos fenólicos foram os componentes com maior atividade antioxidante na planta.

Vieira et al. (2010) estudando folhas secas de OPN, encontraram compostos fenólicos na concentração de 1693 mg EAG.100g⁻¹ em extrato metanólico (80%) e 940 mg EAG.100g⁻¹ em extrato etanólico (80%). Ainda, relataram que a atividade antioxidante de OPN foi 92,6% na concentração de 8,57 µg EAG.mL⁻¹, sendo o IC₅₀ para o radical DPPH de 3,22 µg.mL⁻¹.

Estudo realizado com óleo essencial de *P. aculeata*, identificou que os principais constituintes dessa planta são os diterpenos oxigenados (29,4%) (Souza et al., 2014 b). Já Souza et al. (2016) também estudando óleos essenciais de OPN identificou os sesquiterpenos oxigenados (44,9%) como os principais componentes da planta. Essa diferença nos constituintes da planta foi atribuída a condições ambientais, idade da planta, método de colheita e método de isolamento do óleo essencial (Souza et al., 2016).

Almeida et al. (2014) evidenciaram a presença de substâncias antinutricionais em folhas desidratadas de OPN, dentre elas: ácido oxálico, nitratos, saponinas e inibidor da tripsina. A concentração encontrada para ácido oxálico foi de 41,8 mg.100g⁻¹, valor bastante inferior ao encontrado em espinafre e carambola (180-730 mg.100g⁻¹) (BENEVIDES et al., 2011). O valor de nitrato encontrado por Almeida et al. (2014) foi de 16,2 mg.100g⁻¹, segundo a Organização Mundial da Saúde a ingestão diária aceitável é de até 3,7 mg.kg⁻¹ de peso corpóreo (WHO, 2003). Já as saponinas apresentaram concentração de 0,29 mg.100 g⁻¹, Lásztity, Hidvégi e Bata (1998) relataram que a dose de 50 a 100 mg.kg⁻¹ de peso corporal de saponinas pode ser considerada de baixa toxicidade em animais de sangue quente. Por último, Almeida et al. (2014) relatou que a concentração de inibidor da tripsina foi de

1,82 unidades de tripsina inibida (UTI).mg⁻¹, valores bem inferiores aos encontrado por Carvalho et al. (2002) em duas variedades de soja 46 UTI.mg⁻¹ e 95 UTI.mg⁻¹.

Trabalho realizado por Doetsch et al. (1980), consistindo na identificação de alcaloides em 12 espécies de cactáceas, encontrou nas folhas de OPN o alcaloide tiramina. Já Pinto et al. (2015 a) utilizando o método de Cromatografia Líquida de Ultra Performance identificaram os alcaloides triptamina, mescalina e hordenina, além dos fenólicos, quercetina e petunidina. Além disso, os autores evidenciaram que a OPN possui constituintes químicos com potencial efeito analgésico (Pinto et al., 2015 a).

Pinto et al. (2015 b), analisaram o uso tópico de *P. aculeata* em camundongos, e concluíram que a fração de hexano obtida do extrato metanólico de folhas de OPN possui intensa atividade anti-inflamatória tópica aguda e crônica contra agentes irritantes.

Barbalho et al. (2016), investigaram o uso de farinha de folhas de OPN no perfil metabólico e motilidade intestinal de ratos. Os resultados demonstraram que a farinha dessa planta foi efetiva na redução do percentual de ganho de peso, gordura visceral, triglicerídeos, colesterol total, VLDL e LDL, bem como melhora na motilidade intestinal de ratos.

Silva (2012) estudando a utilização das folhas de OPN na alimentação de ratos *Wistar* em fase de crescimento, substituindo parte da fonte proteica, na forma de caseína, pela planta desidratada e moída, verificou déficit no crescimento e prejuízo no reflexo desses animais.

Embora não tenham grandes evidências de toxicidade da planta *Pereskia aculeata*, também não há evidências *in vivo* de sua inocuidade.

2.3 Toxicidade

Toxicidade é a capacidade de um agente químico de produzir danos aos organismos vivos, em condições padronizadas de uso. O conhecimento da toxicidade das substâncias químicas se obtém, geralmente, por meio de experimentos em laboratório utilizando animais. Os métodos são empregados

com a finalidade de fornecer informações relativas aos efeitos tóxicos e principalmente para avaliar riscos que podem ser extrapolados ao homem (AMDUR et al., 1996). Tais investigações devem ser conduzidas em animais saudáveis, de origem conhecida, com massa corporal e idade adequados (FDA, 2014). No Brasil os estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos são classificados em toxicidade aguda, toxicidade de doses repetidas e genotoxicidade (BRASIL, 2004).

A toxicidade aguda é caracterizada pela administração da substância química numa dose única (ou múltipla num espaço de 24 horas). Diversos guias preconizam que o período de acompanhamento dos animais seja de no mínimo quatorze dias pós-tratamento e que, em todos os grupos experimentais sejam avaliados os sinais clínicos, a massa corporal e ainda, que os animais sejam necropsiados (EMEA, 2012). A análise histopatológica em estudos de toxicidade aguda não é obrigatória, porém diversos estudos têm adotado essa técnica como forma de avaliação, pois pode-se detectar efeitos tóxicos em diversos órgãos de forma rápida e relativamente barata (JOHNSON et al., 1993; OECD, 2008).

Com o teste de toxicidade aguda é possível estimar a Dose Letal (DL₅₀) de uma substância, ou seja, a dose necessária de uma substância para causar a morte de 50 % de uma população em teste. Também pode-se classificar a substância no Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem para Substâncias Químicas (OECD, 2008).

2.4 Citotoxicidade

Um importante sistema de avaliação toxicológica utiliza biomarcadores vegetais, como a alface (*Lactuca sativa* L.), o tomate (*Lycopersicum esculentum* L.) e a cebola (*Allium cepa*), devido a sua sensibilidade e boa correlação com sistemas testes que utilizam mamíferos (DELARMELINA et al., 2012; SOUSA et al., 2010). Além disso, essas espécies apresentam menor resistência ou tolerância aos compostos aleloquímicos, desencadeando, mais facilmente, efeitos citotóxicos (FERREIRA e AQUILA, 2000).

Aleloquímicos são substâncias químicas produzidas por plantas e que podem influenciar o crescimento de outro organismo vivo. No caso das plantas, essa influência pode ser negativa, com a redução da germinação, ou positiva, com o acréscimo no crescimento. Os aleloquímicos são produtos intermediários ou finais do metabolismo secundário (RODRIGUES e LOPES, 2001). O efeito negativo ou positivo desencadeado pelos mesmos em outros organismos, em geral, está associado a concentração testada (REIGOSA et al., 1999).

Os compostos aleloquímicos são muitas vezes utilizados na medicina popular para tratar diversas doenças. A preparação e utilização desses compostos podem trazer muitos benefícios, entretanto, faz-se necessário maiores investigações de seus efeitos genotóxicos e mutagênicos (SOUZA et al., 2005 a). Atualmente, a maioria das pesquisas analisa o efeito dos aleloquímicos sobre o crescimento e a germinação da planta-teste, sem considerar os efeitos celulares relacionados a mudanças fisiológicas (PRATES et al., 2001).

Para avaliar a citotoxicidade de substâncias utiliza-se a técnica de bioensaio, que emprega material biológico como indicador da ação da substância em estudo (PIRES et al., 2001). O efeito citotóxico pode ser avaliado por meio de alterações no processo de divisão celular no organismo que se está testando. Já a genotoxicidade pode ser analisada pela incidência de mutações cromossômicas, como quebras cromatídicas, pontes anafásicas, perda de cromossomos inteiros ou formação de micronúcleos (SOUZA *et al.*, 2005 b).

2.5 Esteroides

Os esteroides são lipídeos estruturais presentes nas membranas da maioria das células eucarióticas (NELSON e COX, 2012). A estrutura básica dos esteroides é de 17 átomos de carbono arranjados em 4 grupos cíclicos, 3 com 6 carbonos (ciclohexanos) e 1 com 5 carbonos (ciclopentano), como pode-se verificar na estrutura do mais simples dos esteroides, o gonano ou

ciclopentanoperidrofenantreno (Figura 2 A). O número de carbonos pode variar de 17 a 30 átomos, que originam uma gama variada de compostos, dentre eles o colesterol (Figura 2 B), os ácidos biliares, hormônios suprarrenais, hormônios sexuais, vitaminas D, glicosídeos cardíacos, fitosteróis e alguns alcaloides (MURRAY, 2013 a).

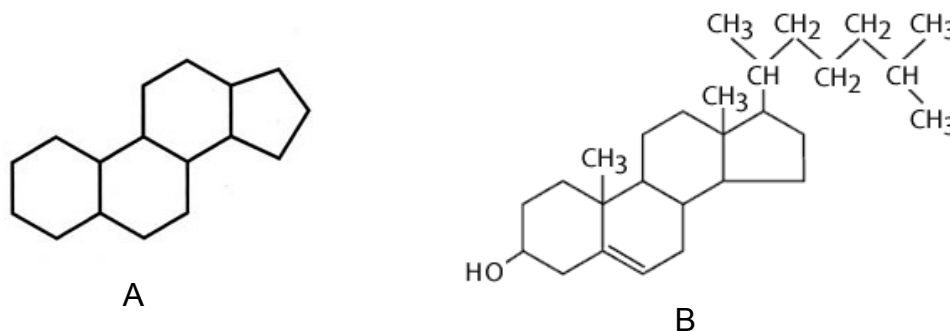


Figura 2. Fórmula estrutural de esteroides. (A) Gonano (B) Colesterol

2.6 Métodos de Identificação de compostos

Uma importante ferramenta na identificação de compostos é a cromatografia, método que visa separar os diversos constituintes de uma mistura de substâncias, seja para identificação, quantificação ou obtenção da substância pura. Tal separação dá-se através da migração da amostra através de uma fase estacionária por intermédio de um fluido (fase móvel) (CRQ, 2010).

A cromatografia líquida de alta performance (HPLC) é bastante utilizada na identificação de compostos, inclusive compostos não voláteis ou instáveis termicamente, o que difere do método de cromatografia gasosa. Além disso, a cromatografia líquida possibilita a identificação de substâncias tanto de baixo quanto de alto peso molecular (CRQ, 2010).

O UPLC (Cromatografia Líquida de Ultra Performance) possui o mesmo princípio de separação de partículas da HPLC, porém, utiliza partículas de tamanhos bem menores e pressões bem mais elevadas, o que possibilita

realizar análises mais rápidas, com menor consumo de solventes e maior eficiência (CRQ, 2010).

Já a Espectrometria de Massas (MS) é definida como o estudo da matéria pela formação de íons em fase gasosa e posteriormente caracterizados por um Espectrômetro de Massas de acordo com sua massa, carga, estrutura ou propriedades físico-químicas (MURRAY et al., 2013 b). O resultado de uma análise por MS se dá pela forma de um espectro, onde a abscissa corresponde à razão entre a massa e o número de cargas do íon (m/z) e a ordenada está relacionada à sua intensidade. A m/z tem como unidade o Dalton (Da). As análises realizadas por MS podem ser qualitativas e/ou quantitativas (MURRAY et al., 2013 b).

A Ressonância Magnética Nuclear (NMR) é uma referência em análise de estruturas moleculares em diversas áreas do conhecimento. Encontra-se na região das ondas de rádio (radiofrequências) e disponibiliza espectros mais simples como os de uma dimensão (1D) de ^1H e ^{13}C ; até mais sofisticados, com duas dimensões (2D), como NOESY (Nuclear Overhauser Enhancement Spectroscopy) e COSY (Homonuclear Correlation Spectroscopy) e três dimensões, como o HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) (KAISER, 2000).

3 Projeto de Pesquisa

3.1 Introdução

A *Pereskia aculeata*, Miller, planta pertencente à família das Cactaceae e que no Brasil é conhecida como ora-pro-nobis, é resistente ao estresse hídrico e possui grande potencial de utilização como complemento alimentar de populações carentes do Brasil e do mundo.

Estudos revelam que as folhas de *P. aculeata* possuem elevados teores de proteína ($28,4 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), sendo que a avaliação do teor de aminoácidos evidenciou que essa planta possui o triptofano como o aminoácido mais abundante e lisina e metionina como os aminoácidos limitantes. Ainda, possuem quantidades elevadas de fibras dietéticas totais ($39,1 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), minerais, principalmente ferro, cálcio, magnésio, manganês e zinco, e vitaminas, A, C e Ácido fólico (TAKEITI et al., 2009).

A *P. aculeata* é encontrada desde o Sul do Brasil até o Sudeste dos Estados Unidos (TAKEITI et al., 2009), é uma planta perene, com características de trepadeira e possui folhas suculentas e lanceoladas. As flores são pequenas e brancas. Os frutos são pequenas bagas amarelas. No caule há a presença de acúleos (falsos espinhos), que nos ramos mais velhos crescem aglomerados (BRASIL, 2010).

A OPN possui folhas suculentas e comestíveis, podendo ser usadas em várias preparações, como farinhas, saladas, refogados, pães, tortas e massas alimentícias (ROCHA et al., 2008). Além da alimentação, a planta pode ser utilizada como ornamental e cultivada para fins de produção de mel pelos apicultores, pois apresenta floração rica em pólen e néctar (BRASIL, 2010).

No mundo, segundo estimativas da Food and Agriculture Organization – FAO, aproximadamente 925 milhões de pessoas passam fome (FAO, 2010). Além disso, um terço da mortalidade de crianças menores de 5 anos em países em desenvolvimento ocorre por eventos ligados a desnutrição (UNICEF, 2006). No Brasil, dados da Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílio, revelam que

30% dos domicílios, aproximadamente 66 milhões de pessoas, se encontram com algum grau de insegurança alimentar (IBGE, 2010).

Muitas ações com a finalidade de minimizar a insegurança alimentar no país já foram aprovadas, elas incluem: geração de emprego e renda; o uso racional dos recursos naturais e da água; o incentivo à agricultura familiar, entre outros (2ª CONFERÊNCIA NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL, 2004).

A agricultura familiar recebeu um grande estímulo a partir de 2009, com a Lei nº 11.947/2009 que dispõe que no mínimo 30% dos recursos financeiros da Alimentação Escolar deverão ser utilizados na aquisição de gêneros alimentícios diretamente da agricultura familiar ou de suas organizações, priorizando-se os assentamentos da reforma agrária, as comunidades tradicionais indígenas e comunidades quilombolas (BRASIL, 2009).

No contexto da diversificação alimentar e do incentivo a geração de renda dos agricultores familiares, aparecem também as plantas alimentícias não convencionais, com enfoque principal para as hortaliças não-convencionais que são aquelas com distribuição limitada, restrita a determinadas localidades ou regiões, exercendo grande influência na alimentação e na cultura de populações tradicionais (KINUPP, 2007).

O resgate e a valorização dessas hortaliças na alimentação representam ganhos importantes do ponto de vista cultural, econômico, social e nutricional considerando a tradição no cultivo, por várias comunidades, e sua contribuição em termos de nutrição. Trata-se de uma questão de segurança e de soberania alimentar estimular a produção e o consumo das hortaliças não-convencionais, em vista de suas características nutricionais e da sua rusticidade de cultivo. (BRASIL, 2010)

A maioria das plantas não-convencionais é desconhecida, e um reduzido número delas apresenta comprovação científica de suas propriedades. Para maior valorização das plantas tradicionais de uso popular são necessários conhecimentos técnicos sobre seu cultivo e uso em grande escala (KINUPP, 2007).

3.2 Justificativa

A OPN apresenta grande potencial alimentar e de cultivo comparada a hortaliças tradicionais destaca-se favoravelmente, especialmente quanto ao perfil de aminoácidos, vitaminas e minerais. Entretanto, a inocuidade à saúde do consumidor carece de avaliação.

3.3 Hipótese

A utilização de OPN, como alimento, não oferece riscos à saúde dos consumidores.

3.4 Objetivos

3.4.1 Geral

Avaliar a inocuidade da planta *Pereskia aculeata* na alimentação.

3.4.2 Específicos

Caracterizar aspectos físico-químicos da planta *P. aculeata* ao longo do cultivo;

Avaliar atividades antimicrobiana e antioxidante, por métodos químicos e biológicos, da planta *P. aculeata*;

Avaliar, através de ensaio biológico, possíveis efeitos adversos resultantes do consumo da planta *P. aculeata*.

3.5 Materiais e métodos

3.5.1 Material experimental

Pereskia aculeata Miller, cultivada junto à Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (Embrapa Clima Temperado), na cidade Pelotas, RS.

3.5.2 Amostragem

Coletas mensais de folhas durante 12 meses. Coleta realizada mediante aferição da altura e diâmetro da projeção da copa da planta, com a finalidade de acompanhar o crescimento das plantas durante o período de experimentação.

3.5.3 Caracterização fenológica

Realizar-se-á um acompanhamento fenológico da planta *Pereskia aculeata*, durante 12 meses, com descrições de eventos como mudança foliar, floração e frutificação e se relacionará com os fatores climáticos, temperatura e disponibilidade de água no solo (MARQUES E OLIVEIRA, 2004).

3.5.4 Cor

A cor será determinada por meio de colorímetro (Minolta Chromometer Modelo CR 300, D65, Osaka, Japan) sendo realizadas três medidas em cada folha e em três folhas de cada lote.

3.5.5 Área foliar

Para a determinação da área foliar se utilizará o aparelho integrador de área, LI-COR 3100, 1996, que se baseia no princípio de células de grade de área conhecida (TAVARES-JÚNIOR et al., 2002).

3.5.6 Atividade antioxidante

A capacidade antioxidante será avaliada utilizando-se o método de sequestro de radicais livres do DPPH (2,2 difenil-1-picrilhidrazil) adaptado de Brand-Williams et al. (1995). Será realizado um extrato metanólico com tempo de 24 horas de extração e as leituras de absorbâncias serão feitas em espectrofotômetro a 517nm. Os cálculos serão efetuados com o auxílio da

seguinte fórmula: % de inibição = $(Ab \text{ branco} - Ab \text{ amostra}) \times 100 / Ab \text{ branco}$. A capacidade antioxidante da planta será expressa em porcentagem de inibição de radicais livres DPPH.

3.5.7 Fenóis totais

A determinação do conteúdo de fenóis totais será por espectrofotometria, pelo método de Folin Ciocalteou, adaptado de Berset et al. (1995). A extração será realizada com metanol na proporção de 1:10 pelo tempo de 2 horas, com agitações a cada 15 minutos. Os resultados serão expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE). As determinações serão realizadas em triplicata, bem como as leituras em espectrofotômetro.

3.5.8 Vitamina C

Para a quantificação do ácido L-ascórbico será utilizado o método adaptado de Vinci et al. (1995) que usa o ácido metafosfórico como solvente de extração e quantificação por meio de HPLC.

3.5.9 Proteína

A proteína bruta será analisada pelo método de microkjeldahl que visa à determinação do nitrogênio orgânico total e inclui as etapas de digestão, destilação e titulação, de acordo com AOAC (1995). Utilizar-se-á o valor de 6,25 na conversão do teor de nitrogênio em proteína.

3.5.10 Umidade

O teor de umidade da planta será determinado em estufa com circulação forçada de ar, de acordo com AOAC (1995).

3.5.11 Determinação da atividade antioxidante *in vivo*

Para a determinação da atividade antioxidante *in vivo* será utilizado o método de Lopes et al. (2004), com células de *Saccharomyces cerevisiae* tratadas com alcalóide isoquinolínico apomorfina como agente estressor e também com o agente oxidativo peróxido de hidrogênio. Na determinação da atividade antioxidante serão utilizadas células na fase estacionária de crescimento, que serão tratadas com as soluções de antioxidantes em presença e ausência de apomorfina. Após isso, serão incubadas e plaqueadas em meio YEPD (Yeast Extract-Peptone-Dextrose). A seguir realizar-se-á a contagem de colônias em cada placa e determinados os percentuais de sobrevivência celular.

3.5.12 Determinação da atividade antimicrobiana

Serão utilizadas cepas padrões de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*. Para a análise microbiológica, as culturas bacterianas serão desenvolvidas em BHI e semeadas na superfície de ágar Mueller-Hinton. A seguir, serão colocados os extratos vegetais, que serão produzidos com etanol, e espera-se o período de incubação. Após, se analisará os halos de inibição das amostras bacterianas. O solvente utilizado na preparação do extrato será usado como controle negativo.

3.5.13 Toxicidade crônica

Para determinar a toxicidade crônica da planta *Pereskia aculeata* serão utilizados ratos machos e fêmeas, da linhagem *Wistar*, em número de 10 de cada sexo, por tratamento, de acordo com o Guia para a realização de estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos (BRASIL, 2004). Os animais serão distribuídos em grupos de tratamento, com 3 diferentes concentrações do extrato da planta *Pereskia aculeata* e grupo controle. O experimento terá duração de 90 dias e contará com avaliações clínicas diárias e controle de

peso semanal. No momento da eutanásia serão realizadas análises bioquímicas do sangue e análises macro e microscópicas dos órgãos: fígado, rins, pulmão, coração, esôfago e estômago, intestinos, órgãos sexuais, pâncreas, adrenal e tireóide.

3.6 Cronograma

Atividade	2012	2013	2014	2015	2016
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X
Caracterização físico-química	X	X			
Avaliações atividades antimicrobiana e antioxidante		X			
Avaliação da toxicidade		X	X		
Qualificação			X		
Defesa de Tese					X

3.7 Referências

2ª CONFERÊNCIA NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL. Carta de Olinda, Olinda, 48 p, 2004.

ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A, D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v.42, n.4, p.751-756, 2012.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Washington. 1995.

BERSET, C.; BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **University of technology**. V. 28, Pg. 25-30, 1995.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M.E., BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie*. V. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL, Resolução-RE Nº 90, de 16 de Março De 2004. **Guia para a realização de estudos de Toxicidade Pré-Clínica de Fitoterápicos**. Brasília, 2004.

BRASIL, Lei 11.947 de 16 de Junho de 2009. **As Novas Diretrizes do Programa Nacional de Alimentação Escolar**. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Hortaliças não-convencionais**. 1ed. Brasília, 2010. 92 p.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of Food and Agriculture**. 1 ed. Roma, 2011. 160 p.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística –. **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, Segurança Alimentar 2004/2009**. Rio de Janeiro, 2010.

KINUPP, V. F. **Plantas alimentícias não-Convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. 2007. 590f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

LOPES, M. I. L.; SAFFIA, J.; ECHEVERRIGARAYA, S.; HENRIQUESA J. A. P.; SALVADORA, M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **Journal of Ethnopharmacology**. V.95, p. 437–445, 2004.

MARQUES, M.C.M.; OLIVEIRA, P.E.A.M. Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas Florestas de Restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**. V.27, n.4, p.713-723, 2004

ROCHA, D. R. C.; PEREIRA JÚNIOR, G. A.; VIEIRA, G.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. S.; PINTO, N. A. V. D. Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, V.19, p. 459-465. 2008.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; PARK, K.J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, p. 148-160. 2009.

TAVARES-JÚNIOR, J.E.; FAVARIN, J.L.; DOURADO-NETO, D.; MAIA, A.H.N.; FAZUOLI, L.C.; BERNARDES, M.S. Análise comparativa de métodos de estimativa de área foliar em cafeeiro. **Bragantia**. V. 61, n. 2, p. 199-203, 2002.

UNICEF - United Nations Children's Fund. **The State of the World's Children**. 1 ed. Nova Iorque, 2006. 156 p.

VINCI, G.; BOTRÈ, F.; MELE, G.; RUGGIERI, G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v.53, p.211-214, 1995.

4 Relatório do Projeto de Pesquisa

4.1 Principais resultados

No primeiro ano da pesquisa procedeu-se a avaliação de aspectos físico-químicos e fenológicos da planta *Pereskia aculeata* em região de clima temperado. Verificou-se que é possível o cultivo dessa planta em regiões mais frias e com geadas, porém considerando-se o período de quiescência, durante o inverno, quando a planta perde todas as folhas. No segundo ano realizou-se experimento para avaliar as características citotóxicas da *Pereskia aculeata*. Não foi observado efeito citotóxico e genotóxico, ou qualquer outro efeito deletério significativo em sementes de alface. No mês de agosto do ano de 2013 teve início o estágio doutoral no exterior (doutorado sanduíche), junto à Universidade da Califórnia em Davis, no Estados Unidos da América, onde realizou-se a avaliação da toxicidade aguda da planta *Pereskia aculeata*. Foram utilizadas 24 ratas, linhagem *Wistar*, que após receberem doses únicas de extrato de folhas de *Pereskia aculeata*, com diferentes concentrações, foram mantidas sob observação durante 15 dias, e então submetidas à eutanásia para caracterização anato-morfo-patológica de 8 órgãos internos. Concluiu-se que a planta não causa toxicidade aguda em concentração de até 5000 mg.kg⁻¹ de peso corporal. Complementarmente procedeu-se a análise da concentração de dezenas de esteroides, ácidos biliares e hormônios reprodutivos, por cromatografia (UPLC-MS/MS), nos referidos 8 órgãos, bem como nos fluidos coletados dos animais, sangue, urina e fezes (resultados preliminares apresentados no apêndice B). A planta foi caracterizada quanto à composição química por cromatografia (HPLC e UPLC) e espectrofotometria de massa. Empregou-se, também, ressonância magnética nuclear para identificação de um composto excepcional (resultados preliminares apresentados no apêndice A). Algumas análises que haviam sido previstas no projeto de pesquisa não foram realizadas devido a falta de tempo e/ou recursos financeiros.

4.2 Principais publicações

SILVA, D. O.; SEIFERT, M. ; NORA, F. R. ; BOBROWSKI, V. ; FREITAG, R. A.; KUCERA, H. R. ; NORA, L. ; GAIKWAD, N. W. Acute toxicity and cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a highly nutritious cactaceae plant. *Journal of Medicinal Food*, 2017 [no prelo].

SILVA, D. O.; PRIMIO, E. M. ; BOTELHO, F. T. ; GULARTE, M. A. Valor nutritivo e análise sensorial de pão de sal adicionado de *Pereskia aculeata*. *DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde*, v. 9, p. 1027-1040, 2014.

SILVA, D.O.; GAIKWAD, N.W.; KUCERA, H.B.; NORA, L.; VARGAS, C.G.; SEIFERT, M. Avaliação da toxicidade aguda de folhas de *Pereskia aculeata*. *Congresso Brasileiro de Nutrição*, 2014.

SILVA, D.O.; KUCERA, H. B.; GAIKWAD, N.W. Effect of Oral administration of *Pereskia aculeata* leaves on fecal bile acids levels in rats. *Oxidants and Antioxidants in Biology*, 2014.

SILVA, D.O.; DODE, J.; SEIFERT, M.; SCHIEDECK, G.; VARGAS, C.G.; NORA, L. Determinação de fenóis totais em folhas de *Pereskia aculeata*. *IV Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos*, 2012.

SILVA, D. O.; HELBIG, E. ; VARGAS, C. G. ; SEIFERT, M. ; DODE, J. ; SILVA, A. L. . Efeito da dieta contendo *Pereskia aculeata*, Miller e da restrição parcial de proteína em ratos. *XIV Encontro de Pós Graduação da UFPel*, 2012.

4.3 Cronograma de atividades

Atividade	2012	2013	2014	2015	2016	2017
Revisão Bibliográfica	X	X	X	X	X	X
Escrita do Projeto de Pesquisa	X					
Qualificação do Projeto de Pesquisa				X		
Caracterização físico-química e fenológica da planta <i>Pereskia aculeata</i>	X	X				
Avaliação da citotoxicidade da planta <i>Pereskia aculeata</i>		X				
Avaliação da toxicidade aguda da planta <i>Pereskia aculeata</i>		X	X			
Avaliação da concentração de esteroides em órgãos e fluidos de ratos tratados com <i>Pereskia aculeata</i>			X			
Identificação de compostos da planta <i>Pereskia aculeata</i>			X			
Análise de dados				X	X	
Redação da tese e de manuscritos para revistas científicas indexadas				X	X	X
Defesa da tese						X

5 Artigo 1

O seguinte artigo foi aceito para publicação na revista *Journal of Medicinal Food*.

**Acute toxicity and cytotoxicity of *Pereskia aculeata*, a highly
nutritious cactaceae plant**

***Pereskia aculeata*: Toxicity and Cytotoxicity**

Debora O. Silva¹, Mauricio Seifert¹, Fabiana R. Nora¹, Vera L. Bobrowski³, Rogerio

A. Freitag⁴, Heidi R. Kucera², Leonardo Nora¹, Nilesh W. Gaikwad^{2*}

1 Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

2 Departments of Nutrition and Environmental Toxicology, University of California Davis, Davis, California, United States of America

3 Departamento de Zoologia e Genética, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

4 Centro de Ciências Química, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil

*Correspondence:

Nilesh W. Gaikwad - 3135 Meyer Hall, One Shields Avenue, Davis, CA, USA. (+1 530) 752-5255. Email: nwgaikead@ucdavis.com

ABSTRACT

Pereskia aculeata is a *Cactaceae* plant with valuable nutritional properties, including, large amounts of protein, minerals, vitamins and fiber. However, *P. aculeata* is reported to contain antinutrients and alkaloids in its leaves. Also, in a study on growth and development, *Wistar* rats fed with *P. aculeata* and casein as protein source grew less than the control group (fed with casein only). Therefore, in this study we evaluated, for the first time, the oral acute toxicity of *P. aculeata* in rats and also, the cytotoxicity behavior of the plant on lettuce seeds. The acute toxicity research was carried out using dried *P. aculeata* ethanolic extract, in 3 different doses, administered by gavage to 24 female *Wistar* rats. The rats were then examined for signs of toxicity, food intake, body weight and fecal excretion fluctuations; as well as histopathological alterations, using 8 different body tissues. The acute toxicity study did not show any difference among the groups, in either clinical evaluation or histopathological analyzes. For the cytotoxicity study, dried *P. aculeata* ethanolic extract was applied on lettuce seeds, in 5 different concentrations. These seeds were evaluated for germination, root and shoot length and mitotic index. The results show that *P. aculeata* extract affects lettuce root and shoot growth, but not germination or mitotic index. Concluding, the acute toxicity on rats and the cytogenotoxicity on lettuce of *P. aculeata* are neglectable, validating the potential of this plant to be used as a functional food.

Key Words: Cytotoxicity; herbal extract; rats; vegetables.

INTRODUCTION

There is marked evidence that deforestation, temperature, and water pollution have a considerable impact on changes in local, regional, and global climate ¹. Some of these changes include warmer drier conditions that could have a large effect on agriculture ². Cultivating and producing plants that are tolerant to adverse climate and soil conditions is an option to sustain livelihood in regions heavily influenced by climate change ^{3,4}. Cactaceae is a family of plants that have adapted anatomical and physiological features, like conserving water, to survive in extremely hot and arid environments ³. Some edible cactaceae like *Opuntia ficus-indica*, *Opuntia cochenillifera*, *Pereskia grandifolia*, and *Pereskia aculeata* are not only tolerant to adverse climate and soil conditions, but are also good sources of minerals, vitamins, phenolic compounds, antioxidants and essential amino acids ⁴, ⁵. Also, recent studies show that some cactaceae extracts can prevent and/or treat different types of diseases ⁵⁻⁹. A remarkable Cactaceae plant is *Pereskia aculeata* Miller (*P. aculeata*), a non-conventional leafy vegetable noteworthy source of protein (28.4 g.100 g⁻¹ of dry weight, dw), dietary fiber (39.1 g.100 g⁻¹ of dw), minerals and vitamins ¹⁰. *P. aculeata* is found in tropical areas ranging from the southern United States to south Brazil and is known as ora-pro-nobis, or, in some Latin America countries, as Barbados Gooseberry ¹¹. It is a perennial green broad leaf, with characteristics of climbing plants which are very resistant to hydric stress ¹² (Fig 1). The succulent leaves of *P. aculeata* can be used in many food preparations such as: salads, stews, flours, breads, pies and pastas ¹³. In folk medicine, *P. aculeata* is reported to be used as an anti-inflammatory, emollient, expectorant and antisypilitic ⁵.



Fig 1. Pictures of the plant *Pereskia aculeata* Miller (A) Leaves, (B) Flowers, and (C) Fruits.

Cactaceae exhibit strange shapes, spines, and showy flowers, therefore appearing as an unusual choice of cuisine. However, *P. aculeata* does not look exactly alike and is a great source of many minerals (Table 1). In 100 g of *P. aculeata*, the calcium content is equivalent to three-fold the daily requirement and is 20-fold higher than in the non-dairy source kale; the iron content is equivalent to 1.09-fold the daily requirement and is 5.7-fold higher than in the non-heme source spinach; the zinc content is equivalent to 2.6-fold the daily requirement and 3.3-fold higher than in the pumpkin seed, which is valued as a source of this mineral^{10, 14-17}.

Table 1. Mineral contents in *Pereskia aculeata* leaves and ten other mineral rich foods.

Foods	Mineral Content (mg.100 g ⁻¹)								
	Fe	Zn	Ca	Mg	P	K	Cu	B	Mn
<i>Pereskia aculeata</i>^a, raw	14.20	26.70	3420	1900	156	1632	1.4	5.6	46.4
<i>Pereskia aculeata</i>^b, dried	9.40	5.90	2160	680	450	3740	0.9	2.8	2.8
Almond^c, dried	3.71	3.12	269	270	481	733	-	-	-
Beef^c, ground cooked	2.67	6.19	25	22	213	353	-	-	-
Broccoli^c, raw	0.73	0.41	47	21	66	316	-	-	-
Fish^c, tuna cooked	1.31	0.77	10	64	326	323	-	-	-
Kale^c, raw	1.47	0.56	150	47	92	491	-	-	-
Milk^c, whole	0.03	0.37	113	10	84	132	-	-	-
Potato^c, white baked	0.64	0.35	10	27	75	544	-	-	-
Pumpkin Seed^c, dried	8.82	7.81	46	592	1233	809	-	-	-
Red Cabbage^c, raw	0.80	0.22	45	16	30	243	-	-	-
Spinach^c, raw	2.71	0.53	99	79	49	558	-	-	-

^a Takeiti et al. [10] doi: 10.1080/09637480802534509);

^b Oliveira et al. [14] doi: 10.1590/S0102-05362013000300021);

^c U.S. Department of Agriculture [16] <http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>

However, despite the potential of *P. aculeata* as a functional food, the plant is reported to contain antinutrients and alkaloids in its leaves ^{18,19}. The antinutrients identified were oxalic acid (41.8 mg.100 g⁻¹), nitrate (16.2 mg.100 g⁻¹), saponin (0.29 mg.100 g⁻¹) and trypsin inhibitor (1.82 trypsin inhibitor units /

mg) ¹⁸. As well the alkaloids reported in *P. aculeata* leaves are tryptamine, mescaline and hordenine ¹⁹. Also, in a study on growth and development, *Wistar* rats fed with *P. aculeata* and casein as protein source grew less than the control group (fed with casein only) ²⁰.

Therefore, in this study we investigated the oral acute toxicity of *P. aculeata* on rats and also, the cytotoxicity behavior of the plant on lettuce seeds. To our knowledge this is the first investigation of oral acute toxicity on rats and cytotoxicity on lettuce of *P. aculeata*.

MATERIALS AND METHODS

Ethanolic extract of *Pereskia aculeata* leaves

The leaves of *Pereskia aculeata* Miller were harvested from the experimental fields of Federal University of Pelotas - Agronomy School, located in Capão do Leão, RS, Brazil (31° 80' 23" S latitude and 52° 41' 40" W longitude). Immediately after harvest the fresh leaves were weighed to approximately 1.5 kg, frozen in liquid nitrogen and stored at - 80 °C. The samples were ground to a fine powder in a ball mill (Marconi MA350) in liquid nitrogen. Ethanol (99.5 %) was added (2 mL per g of fresh leaves), and kept at 60 °C under vigorous stirring for 3 h. The extract was filtered using qualitative filter paper (Whatman, grade 1) and kept on ice. The extraction process was repeated two more times and the filtrates of each extraction were combined. The ethanolic extract was concentrated using a rotary evaporator (Heidolph, Laborota 400). Further, the extract was freeze-dried and the resulting powder (21.39 g in total) was stored at - 20 °C. The freeze-dried extract was completely soluble in water.

Ethics Statement

The protocol was approved by the Institutional Animal Care and Use Committee of University of California Davis (approval #17873). The study was conducted at the Teaching Research and Animal Care Services facilities at University of California Davis and all procedures were administered according to the Institute for Laboratory Animal Research and the Organization for Economic Co-operation and Development guidelines ²¹. The rats were humanely euthanized by CO₂ asphyxiation, followed by cardiac exsanguination and all efforts were made to minimize suffering.

Acute Toxicity in Rats

Twenty four female rats *Wistar* weighing from 160 g to 180 g were kept under controlled housing conditions: 25 °C ± 2 °C, 50 % ± 15 % relative humidity, and photoperiod of 12 h. The rats were acclimated to the housing conditions for five days prior to commencement of the experiment. Conventional rat diets and drinking water were available *ad libitum*, except during the fasting period. The rats were randomly assigned into 4 groups (G1, G2, G3 and G4). The rats were fasted for 12 h, with free access to drinking water, prior to a single administration of 0 mg (G1), 1250 mg (G2), 2500 mg (G3) and 5000 mg (G4) of *P. aculeata* dry extract per kg of body weight. The *P. aculeata* extracts were suspended in water and administered by gavage. G1 received only water by gavage.

After the single administration of plant extract, the animals were observed for signs of toxicity at 1 h, 2 h, 4 h, 8 h and then once a day, for 14 days. Signs of toxicity were evaluated analyzing changes in the skin, fur, eyes, mucous

membranes, respiratory system, locomotion, and occurrence of convulsion, diarrhea, excess salivation, lethargy and mortality. All animal weights and food intake were recorded weekly. All animal feces were collected and weighed daily.

Histopathology analysis

Gross morphometric weight was recorded for the whole animal, spleen, liver, kidneys and brain and used to calculate the organ-to-body weight ratio. Liver, lung, brain, heart, mammary gland, gastrointestinal tract, spleen and kidney were sampled for histopathology. Tissue samples were submersion-fixed in 10 % neutral-buffered formalin, routinely processed, embedded in paraffin, sectioned 5 µm – 10 µm thick and stained with hematoxylin and eosin ²². The stained tissue sections, from a subset of rats (16), were blindly evaluated by a board-certified Veterinary Anatomic Pathologist.

Cytotoxic Bioassays

Lettuce (*Lactuca sativa* cv. *Baba de Verão*) seeds were sowed on Germitest[®] paper, placed onto the bottom of a plastic germination box (Gerbox[®]), and dampened with 8 mL of water containing *P. aculeata* dry extract at different concentrations: 13.00 mg/mL (100 %), 6.50 mg/mL (50 %), 3.25 mg/mL (25 %), 1.30 mg/mL (10 %) and 0.13 mg/mL (1 %). For the control treatment, 8 mL of distilled water was used. The Gerbox[®] were placed into a growth cabinet for seed germination at 25 °C ²³.

The physiologic effects of *P. aculeata* on lettuce seeds were evaluated by: (a) seed germination (%) on the forth day (n = 5), (b) and on the seventh day (n = 5),

(c) root length (mm) on the seventh day ($n = 40$), and (d) shoot length (mm) on the seventh day ($n = 40$)^{23, 24}. The experimental unit consisted of 100 seeds for the variables seed germination and 40 plantlets for the variables root length and shoot length.

Cytogenetic Bioassay

The cytogenetic effects were evaluated by the mitotic index and by the presence of chromosome abnormality, following the method described by Guerra²⁵, with some modification. We collected the rootlets of the lettuce at 4 days of treatment and kept them in ethanol and acetic acid (3:1), with the dye acetic orcein (2 %). To determine the mitotic index and chromosomal abnormalities 100 cells were analyzed per slide, with four slides for each treatment, totalizing 2400 cells analyzed on an optical microscope (400x).

Statistical Analysis

In this acute toxicity study, the experiment was performed in a completely randomized fashion, with 6 replicates ($n = 6$). One-way analysis of variance was used for body weight, food intake, and fecal excretion, at 5 % significance ($p \leq 0.05$). The cytotoxic bioassays were analyzed by confidence interval (95 % CI). The Statistical Analysis Software (SAS/STAT)²⁶ was used to analyze the data.

RESULTS

Acute Toxicity

The administration of *P. aculeata* did not cause toxicity symptoms in any of the treatment groups. All rats in the acute toxicity study showed similar visual characteristics to that of the control group. There were no changes in the skin, fur, eyes, mucous membranes, respiration, locomotion, convulsion, salivation, lethargy, or mortality in any of the rats throughout the study.

Furthermore, the groups of rats not treated or treated with different doses of *P. aculeata* did not differ (F test, $p \leq 0.05$) from each other for the variables food intake, body weight and fecal excretion. The average for these variables were 14.56 ± 0.16 g, 171.19 ± 1.35 g and 1.88 ± 0.09 g, respectively.

Organ-to-body weight ratio for spleen (0.26 ± 0.01), liver (3.97 ± 0.20), kidneys (0.83 ± 0.04) and brain (1.02 ± 0.05) was not different from the control group for any of the treatment groups, suggesting that there was no inflammation of any organs after administration of *P. aculeata*. Furthermore, results for the histopathology in the tissues liver, lung, brain, heart, mammary gland, gastrointestinal tract, spleen and kidney also did not present any difference between the four groups. Representative histopathological data from liver and kidney is shown in Fig 2.

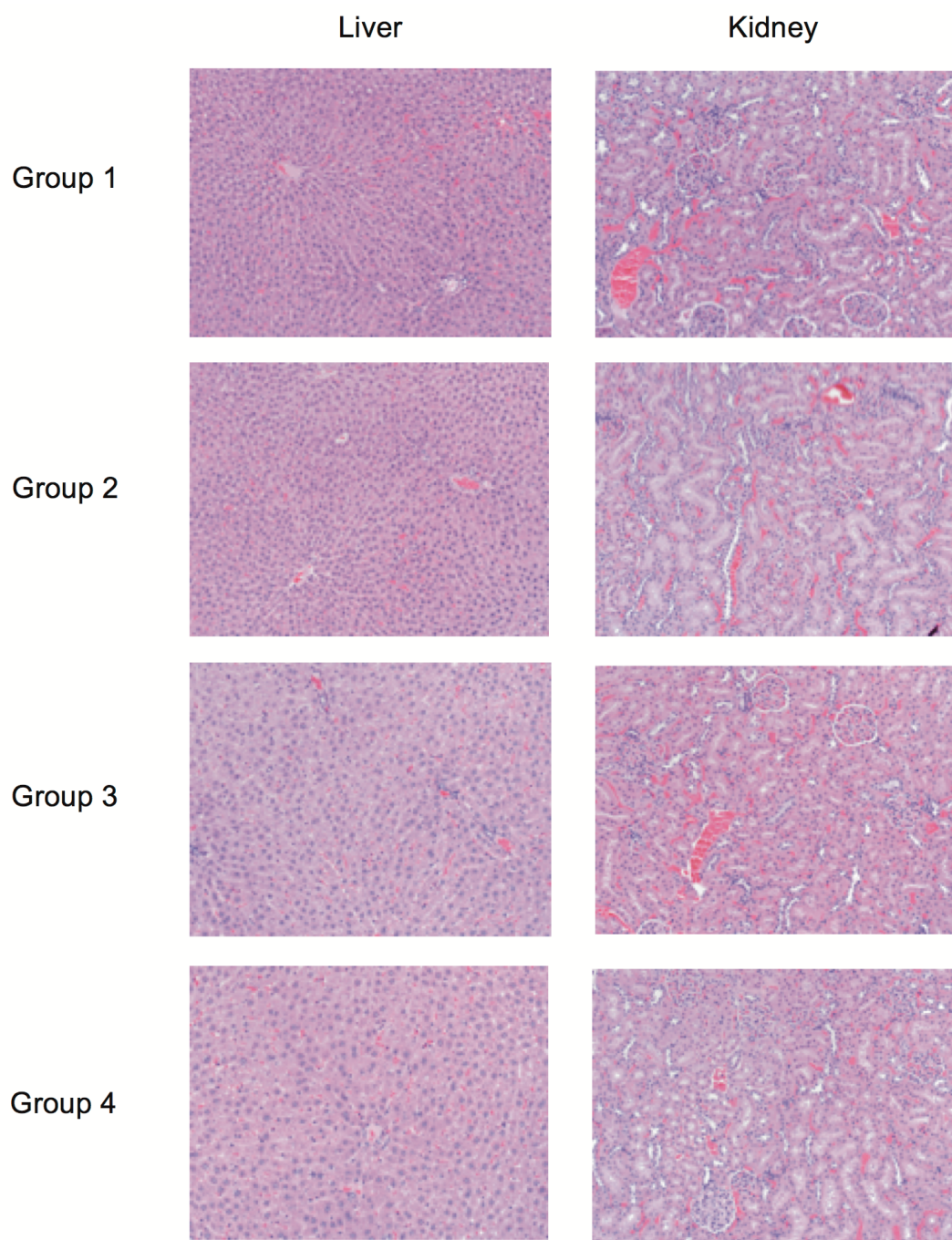


Fig 2. Representative histopathology analysis of liver and kidney (10 x magnification) in rats treated with *Pereskia aculeata* for acute toxicity study. The groups (G) of rats received by gavage a single dose of 0 mg (G1), 1250 mg (G2), 2500 mg (G3) and 5000 mg (G4) of *P. aculeata* dry extract per kg of body weight.

Cytotoxic Bioassays

The results from the seed germination, root and shoot length and mitotic index of *P. aculeata* extracts effect on lettuce are presented in Fig 3.

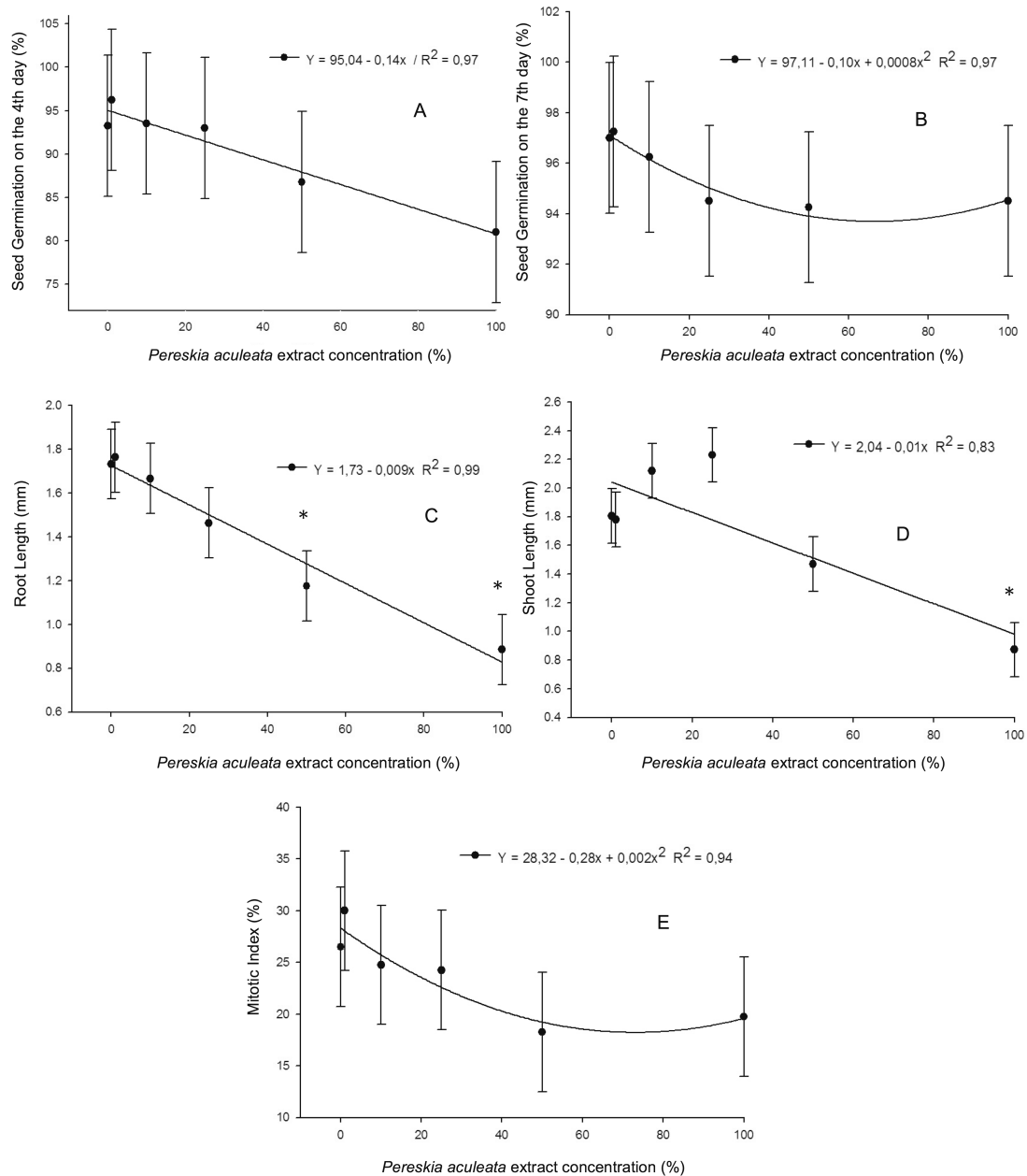


Fig 3. Cytotoxic effects of *Pereskia aculeata* extract on lettuce (*Lactuca sativa* cv. *Baba de Verão*) seeds, with different concentrations: 13.00 mg/mL (100 %),

6.50 mg/mL (50 %), 3.25 mg/mL (25 %), 1.30 mg/mL (10 %), 0.13 mg/mL (1 %) and 0.00 mg/mL (0 %). The variables analyzed were: (A) seed germination on the fourth day (n = 5), (B) seed germination on the seventh day (n = 5), (C) root length (n = 40), (D) shoot length (n = 40) and (E) mitotic index (n = 4). The bars indicate the confidence interval at 95 % level. * Indicates results that differ from the control.

Polynomial equations models, linear (seed germination on the fourth day, shoot length and root length) and quadratic (seed germination on the seventh day and mitotic index), best represented the relationship between different dose of *P. aculeata* and the variables analyzed on lettuce.

Our results show that *P. aculeata* extract had no significant physiological effect on seed germination on the fourth or seventh day at any concentration when compared to the controls (Fig 3: A and B).

However, *P. aculeata* had an effect on lettuce root and shoot length. *P. aculeata* significantly decreased lettuce root length at 6.5 mg/mL (dose 50 %) and 13 mg/mL (dose 100 %) compared to the controls (Fig 3: C). Lettuce shoot length increased at 3.3 mg/mL (dose 25 %) extract, but then decreased at 13 mg/mL (dose 100 %) extract significantly when compared to the control (Fig 3: D).

The mitotic index showed that *P. aculeata* extract did not present any cytogenetic effect on the lettuce (Fig 3: E). Furthermore, microscopic analysis of the lettuce cells did not show any chromosomal alteration, suggesting *P. aculeata* is not genotoxic to lettuce.

DISCUSSION

Acute toxicity studies allow for a first look at potential toxicity of a plant on an organism ²⁷. The traditional aim of the acute oral toxicity study is the estimation of LD50, the median lethal oral dose, derived from a single dose of a substance that can be expected to cause death in 50 % of animals when administered by the oral route ^{28,29}. As no deaths were reported in our study, the LD50 values of *Pereskia aculeata* extracts is > 5000 mg/kg. The concentration of 5000 mg/kg of body weight is equivalent to 385 g of fresh leaves per kg of body weight. Considering these results and the standard established by the Organization for Economic Co-operation and Development, *P. aculeata* is a class 5, which is the lowest toxicity class ^{29,30}.

Our results are congruent with previous reports of cactaceae, in the same botanical family as *P. aculeata*, to be safe for oral consumption in animals ^{31,32}. A study evaluating oral toxicity of *P. grandifolia* and *P. bleo* in mice, found no signs of toxicity at the top dose of 2500 mg/kg of body weight ³¹. Another one, studying the topical anti-inflammatory activity of *P. aculeata* leaves in models of acute and chronic ear dermatitis in mice, did not find signs of toxicity or acute dermal irritation ³³. Also, a research analyzing the acute toxicity of red cabbage, in mice, using ethanolic extract and having 5000 mg/kg of body weight as top concentration and the results showed no signs of toxicity at a single dose administration ³⁴. To our knowledge there are no published reports on the oral toxicity of *P. aculeata*. According to our results, the single maximum oral dose (5000 mg of *P. aculeata* dry extract per kg of body weight) does not cause adverse effects in rats. Therefore, remains the potential of *P. aculeata*, a resilient plant for

cultivation under low soil water availability, to be used as a remarkable source of minerals, Ca, Zn, Fe, Mg, P, and K (Table 1), proteins, vitamins, antioxidants and fibers in the food industry and to mitigate under nutrition in the world ^{10, 14}. *Pereskia aculeata* can be compared as safe as the conventional vegetable red cabbage, but with a superior nutritional content than that ¹⁶.

Histopathology evaluations provide a rapid method to detect effects of irritants in various organs ³⁵. When compared to the control group no alterations in histopathological parameters were observed, within any of the eight tissues analyzed (Fig. 2). Organ weight is a relevant trial in toxicological analysis to indicate an effect of an experimental compound. Differences in organ weight between treated and untreated animals can happen even in absence of any morphological changes ^{36, 37}. Ours results on organ-to-body weight ratio did not show any difference among the groups.

The cytogenetic bioassays are an important tool to investigate toxicity, because they can identify the effects of substances on the chromosome level and in the cell cycle, also, plant cytotoxic bioassays have a good correlation with mammalian test systems^{18, 38, 39}. We chose lettuce cultivation to study cytotoxic effect, because it is a sensitive species and a widely used plant in toxicity research ^{24, 40}.

Our results demonstrate that *P. aculeata* extract does not contain metabolites that affect germination or cause a cytogenotoxic effect on lettuce seeds, suggesting that membranes, transcription, or translation were not affected in the cells ²⁴. However, our study indicates that *P. aculeata* has a potential

physiological effect on roots and shoots growth of lettuce. Plants can influence the growth and development of another plant, increasing or decreasing growth and/or seed germination ⁴¹. This interaction between plants happens through the release of chemical compounds (allelochemicals) in the environment ⁴².

In conclusion, our results demonstrate that the acute toxicity on rats and the cytogenotoxicity on lettuce of *P. aculeata* are neglectable, therefore validating the potential of this nutritious cactaceae plant to be used as a functional food.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors acknowledge CAPES, CNPq and FAPERGS from Brazilian Government, for financial support and a Ph.D. grant, and the West Coast Metabolomics Center, for funding the work developed at the Departments of Nutrition and Environmental Toxicology at University of California Davis.

AUTHOR DISCLOSURE STATEMENT

No competing financial interests exist.

REFERENCES

1. Gornall J, Betts R, Burke E, et al.: Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;365(1554):2973-2989.

2. Strzepek K, Boehlert B: Competition for water for the food system. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*. 2010;365(1554):2927-2940.
3. Shetty AA, Rana MK, Preetham SP: Cactus: a medicinal food. *J Food Sci Tech*. 2012;49(5):530-536.
4. Kinupp VF, Barros IBId: Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. *Food Sci. Technol (Campinas)*. 2008;28:846-857.
5. Pinto NdCC, Santos RCd, Machado DC, et al.: Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. *PhOL*. 2012;3:63-69.
6. Moran-Ramos S, Avila-Nava A, Tovar AR, Pedraza-Chaverri J, Lopez-Romero P, Torres N: *Opuntia ficus-indica* (nopal) attenuates hepatic steatosis and oxidative stress in obese zucker (fa/fa) rats. *J Nutr*. 2012;142(11):1956-1963.
7. Kazama CC, Uchida DT, Canzi KN, et al.: Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw. (*Cactaceae*). *J Ethnopharmacol*. 2012;144(1):86-93.
8. Jimenez-Aspee F, Alberto MR, Quispe C, et al.: Anti-inflammatory activity of copao (*Eulychnia acida* Phil., *Cactaceae*) fruits. *Plant Foods Hum Nutr*. 2015;70(2):135-140.
9. Filannino P, Cavoski I, Thlien N, et al.: Lactic Acid Fermentation of Cactus Cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) Generates Flavonoid Derivatives with Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. *PLoS ONE*. 2016;11(3):e0152575.

10. Takeiti CY, Antonio GC, Motta EMP, Collares-Queiroz FP, Park KJ: Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *Int J Food Sci Nutr*. 2009;60:148-160.
11. Sharif KM, Rahman MM, Zaidul ISM, et al.: Pharmacological relevance of primitive leafy cactuses *Pereskia*. *Res J Biotechnol*. 2013;8(12):134-142.
12. Brasil Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento: Manual de hortaliças não-convencionais. Brasília: Mapa/ACS; 2010:92.
13. Rocha DRdC, Pereira Júnior GA, Vieira G, Pantoja L, Santos ASd, Pinto NAVD: Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. *Alim. Nutr*. 2008;19(4):459-465.
14. Oliveira DdCdS, Wobeto C, Zanuzo MR, Severgnini C: Composição mineral e teor de ácido ascórbico nas folhas de quatro espécies olerícolas não-convencionais. *Hortic Bras*. 2013;31:472-475.
15. U.S. Department of Agriculture: Dietary reference intakes (DRIs): estimated average requirements. Beltsville, Maryland.: USDA; 2014.
16. U.S. Department of Agriculture: Research Service, Nutrient Data Laboratory. USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release 27 (slightly revised). Beltsville, Maryland.: USDA; 2015.
17. Glew RH, Glew RS, Chuang LT, et al.: Amino acid, mineral and fatty acid content of pumpkin seeds (*Cucurbita* spp) and *Cyperus esculentus* nuts in the Republic of Niger. *Plant Foods Hum Nutr*. 2006;61(2):51-56.

- 18.** Almeida MEFd, Junqueira AMB, Simão AA, Corrêa AD: Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. *Biosci J.* 2014;30(3):9.
- 19.** Pinto NDC, Duque APD, Pacheco NR, et al.: *Pereskia aculeata*: A plant food with antinociceptive activity. *Pharmaceutical Biology.* 2015;53(12):1780-1785.
- 20.** Silva DOd: *Avaliação do crescimento e desenvolvimento de ratos tratados com Pereskia aculeata, Miller* [Dissertation]. Pelotas: Programa de Pós-Graduação em Nutrição e Alimentos, Universidade Federal de Pelotas; 2012.
- 21.** OECD: OECD Guidelines for the testing of chemicals. Guidelines 425: acute oral toxicity – up-and-down-procedure (UDP)2008.
- 22.** Mcmanus JGA, Mowry RW: *Staining methods: histological and histochemical.* New York: Harper & Row; 1984.
- 23.** Souza SAM, Cattelan LV, Vargas DP, Piana CFdB, Bobrowski VL, Rocha BHG: Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. ex. Reiss.). *UEPG Biol. Health Sci.* 2005;11(3):7-14.
- 24.** Oliveira AKMd, Matias R, Lopes SS, Fontoura FM: Allelopathy and influence of leaves of *Palicourea rigida* (*Rubiaceae*) on seed germination and seedling formation in lettuce. *Biosci J.* 2014;30(5):938-947.
- 25.** Guerra M: High amount of heterochromatin in a tropical tree species: *Genipa americana* L. (*Rubiaceae*). *Cytologia.* 1993;58:427-432.

26. SAS/STAT: SAS-STAT User's guide: release 6.03 edition. 1988;
<http://dl.acm.org/citation.cfm?id=61079>. Accessed 26 July 2014.
27. Déciga-Campos M, Rivero-Cruz I, Arriaga-Alba M, et al.: Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. *J Ethnopharmacol*. 2007;110(2):334-342.
28. Shushunov S, Balashov L, Kravtsova A, Krasnogorsky I, Latte KP, Vasiliev A: Determination of Acute Toxicity of the Aqueous Extract of *Potentilla erecta* (Tormetil) Rhizomes in Rats and Mice. *Journal of Medicinal Food*. 2009;12(5):1173-1176.
29. OECD: OECD Guidelines for the testing of chemicals. Guidelines 420: Acute oral toxicity – fixed dose procedure 2001.
30. Albaayit SFA, Abba Y, Abdullah R, Abdullah N: Evaluation of antioxidant activity and acute toxicity of *Clausena excavata* leaves extract. *Evid Based Complement Alternat Med*. 2014;2014:1-10.
31. Sim KS, Nurestri AMS, Sinniah SK, Kim KH, Norhanom AW: Acute oral toxicity of *Pereskia bleo* and *Pereskia grandifolia* in mice. *Pharmacogn Mag*. 2010;6(21):67-70.
32. Hor SY, Ahmad M, Farsi E, et al.: Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): acute and subchronic toxicity studies. *Regul Toxicol Pharm*. 2012;63(1):106-114.

33. Pinto NdCC, Machado DC, Silva JMd, et al.: *Pereskia aculeata* Miller leaves present *in vivo* topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. *Journal of Ethnopharmacology*. 2015;173:330-337.
34. Thounaojam MC, Jadeja RN, Sankhari JM, Devkar RV, Ramachandran AV: Safety Evaluations on Ethanolic Extract of Red Cabbage (*Brassica oleracea* L.) in Mice. *Journal of Food Science*. 2011;76(1):T35-T39.
35. Johnson LL, Stehr CM, Olson OP, et al.: Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the northeast coast of the united-states. *Environmental Science & Technology*. 1993;27(13):2759-2771.
36. Prabu PC, Panchapakesan S, Raj CD: Acute and Sub-Acute Oral Toxicity Assessment of the Hydroalcoholic Extract of *Withania somnifera* Roots in Wistar Rats. *Phytotherapy Research*. 2013;27(8):1169-1178.
37. Bailey SA, Zidell RH, Perry RW: Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: What is the best analytical endpoint? *Toxicologic Pathology*. 2004;32(4):448-466.
38. Sousa SM, Silva PS, Viccini LF: Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. *Anais da Academia Brasileira de Ciências*. 2010;82:305-311.
39. Lubini G, Fachinetto JM, Laughinghouse HD, Paranhos JT, Silva ACF, Tedesco SB: Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. *Biologia*. 2008;63(5):647-651.

- 40.** Sanderson K, Bariccatti RA, Primieri C, Viana OH, Viecegli CA, Bleil HG: Allelopathic influence of the aqueous extract of jatropha on lettuce (*Lactuca sativa* var. Grand Rapids) germination and development. *J Food Agric Env.* 2013;11(1):641-643.
- 41.** Reigosa MJ, Sanchez-Moreiras A, Gonzalez L: Ecophysiological approach in allelopathy. *Crit Rev Plant Sci.* 1999;18(5):577-608.
- 42.** Cheng F, Cheng Z: Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. *Frontiers in Plant Science.* 2015;6(1020).

6 Artigo 2

O seguinte manuscrito foi submetido para publicação na revista *Horticultura Brasileira*.

**PHENOLOGICAL AND PHYSICOCHEMICAL PROPERTIES OF *Pereskia*
aculeata DURING CULTIVATION IN SOUTH BRAZIL**

Débora O Silva¹; Maurício Seifert¹; Gustavo Schiedeck²; Juliana S Dode¹; Leonardo Nora¹.

¹ Universidade Federal de Pelotas, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel,
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Campus Universitário, S/N,
CEP: 96160-000, Capão do leão, RS, Brasil. deca116@hotmail.com;
mau.seifert@gmail.com; ju_dode@hotmail.com; l.nora@me.com

² Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (EMBRAPA Clima Temperado).
Rodovia BR-392, Km 78, CEP: 96010-971 - Pelotas, RS, Brasil.
gustavo.schiedeck@cpact.embrapa.br

ABSTRACT

Pereskia aculeata, known as ora-pro-nobis in Brazil, is native from tropical dry forests. This *Cactaceae* plant possesses succulent and edible leaves, which contain high amounts of protein, minerals, vitamins and fiber. The nutritional properties and ability to grow under limited water supply of *P. aculeata* are known, but little information is available about the growth behavior and composition of this plant when cultivated under a temperate humid climate. Therefore, we evaluated some phenological and physicochemical characteristics of *P. aculeata* cultivated in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, under temperate and humid climate. We observed that *P. aculeata* developed normally, but with a quiescent state in the winter, without producing leaves. The flowering of the plant started on February and the fructification started one month later. The physicochemical characteristics (humidity, leaf area, protein, color, total phenolic content and antioxidant activity) varied through the period of cultivation. All our findings support that cultivation of *P. aculeata* for production of leaves is feasible under temperate and humid climate.

Keywords: *Pereskia aculeata* Miller; Ora-pro-nobis, *Cactaceae*, quiescent state, phenology.

PROPRIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS E FENOLÓGICAS DA PLANTA *Pereskia aculeata* CULTIVADA NO SUL DO BRASIL

RESUMO

Pereskia aculeata é uma cactácea nativa de regiões tropicais e de clima seco, no Brasil é conhecida popularmente como ora-pro-nobis. Possui folhas suculentas e comestíveis, com altos teores de proteína, minerais, vitaminas e fibras. Propriedades nutricionais e caracterização de desenvolvimento em regiões de clima seco já são conhecidas sobre essa planta, porém muito pouco se sabe sobre a possibilidade do seu cultivo e composição nutricional em áreas de clima temperado e úmido. Por isso, decidiu-se avaliar as propriedades físico-químicas e fenológicas da planta *Pereskia aculeata* cultivada em Pelotas, Rio Grande do Sul. Os resultados sugerem que a *Pereskia aculeata* pode ser cultivada em regiões de clima temperado e úmido, porém durante o inverno a planta permanecerá no estado de quiescência e não produzirá folhas. O ciclo dessa planta se mostrou bastante relacionado a

temperatura do ambiente, com início do período de floração no mês de fevereiro e a frutificação no mês seguinte. As análises físico-químicas (umidade, área foliar, proteína, cor, fenóis totais e atividade antioxidante) variaram durante todos os meses de cultivo. Os resultados sugerem que é possível cultivar a planta *P. aculeata* em regiões temperadas e úmidas.

Palavras-chave: *Pereskia aculeata* Miller; Ora-pro-nobis, *Cactaceae*, quiescência, fenologia.

INTRODUCTION

Pereskia aculeata, Miller (*P. aculeata*) is a plant member of the *Cactaceae* family and is found in tropical areas from the south of United States to south Brazil. It is known, popularly, as ora-pro-nobis and in some Latin America countries is known as Barbados Gooseberry (Takeiti *et al.*, 2009; Sharif *et al.*, 2013).

P. aculeata is a perennial shrub, very resistant to draught, and has scramble vine characteristics. The flowers are white and small, the fruits are small yellow berries, and also, the plant has spines at the stems and large leaves (Brasil, 2010).

Pereskia aculeata possesses succulent and edible leaves, which can be used in many preparations, such as: salads, stews, flours, breads, pies and pastas (Rocha *et al.*, 2008). Other than food, the plant can be used ornamentally or cultivated for honey production once it is rich in pollen and nectar. Folk medicine practitioners have been known to use *P. aculeata* as an anti-inflammatory, emollient, expectorant and antisiphilitic (Sartor *et al.*, 2010).

P. aculeata leaves are high in protein (28.4 g.100 g⁻¹ of dry weight, dw) when compared with other vegetables source of protein, like black beans (8.8 g.100 g⁻¹ of cooked weight, cw), garbanzo beans (8.9 g.100 g⁻¹ of cw) and lentils (9.0 g.100 g⁻¹ of cw) (Takeiti *et al.*, 2009; USDA, 2014).

Also, this plant is a remarkable source of nutritionally important minerals (Takeiti *et al.*, 2009; Oliveira *et al.*, 2013). Fresh *P. aculeata* leaves contains more calcium (20.0 fold), iron (5.7 fold) and zinc (3.3 fold) than kale, spinach, and pumpkin seeds, respectively, considered rich vegetable sources for these minerals (Takeiti *et al.*, 2009; USDA, 2014). *P. aculeata* leaves contain high levels of fiber (39.1 g.100 g⁻¹ of dw), vitamin C (185.8 mg.100 g⁻¹ of dw) and folic acid (19.3 mg.100 g⁻¹ of dw) (Takeiti *et al.*, 2009).

Therefore, *P. aculeata* could be a good alternative to many common food sources, mainly for vegetarians and vegans, because it has high levels of minerals and proteins (Takeiti *et al.*, 2009).

P. aculeata is known to be native from tropical dry forests (Takeiti *et al.*, 2009; Brasil, 2010). To our knowledge, growth behavior and composition of this plant when cultivated under a temperate humid climate is unknown. Therefore, we evaluated some phenological and physicochemical characteristics of *P. aculeata* cultivated in Pelotas, Rio Grande do Sul, Brazil, under temperate and humid climate.

MATERIAL AND METHODS

Plant Material

The *Pereskia aculeata* Miller was cultivated at the Brazilian Agricultural Research Corporation (Embrapa Clima Temperado), located in Pelotas, RS, Brazil (S 31°37'14'' latitude and W 52°31'19'' longitude). The plants were monthly harvested from June of 2012 to June of 2013. In the moment of the harvest the plants were measured, to determine the height. Also, the phenological aspects were determined with observation of new leaves, flowering and fruiting. These processes were related with climate changes, as precipitation and temperature (Marques & Oliveira, 2004).

The harvested leaves were cleaned, grounded to a fine powder in a ball mill in liquid nitrogen and stored at - 80 °C for future analyzes (antioxidant activity, phenol and protein). The leaves were also analyzed for humidity, color and leaf area.

Physicochemical Evaluations

To determine the humidity, 10 leaves were weighted and dried for 24 hours in a forced air oven at 105 °C, according AOAC (1995). The leaf area was determined using a leaf area meter (LI-COR® 3100C), according to Tavares Junior et al. (2002).

Color was determined using a colorimeter (Minolta®, Model CR 300). Were measured lightness (L*), redness (a*) and yellowness (b*) in 3 parts of each leaf, with a total of 30 leaves for month of analyze, adapted from CIE (2004). The parameters of color were expressed in lightness, where L* = 0 is completely black,

and $L^* = 100$ is completely white; and Hue angle (H^*), calculated from $H^* = [\text{Arc tan } (b/a)]$, where $H^* = 0$ is red, $H^*=90$ is yellow, $H^*= 180$ is green and $H^* = 270$ is blue.

The antioxidant activity was estimated using the free radical 2,2-Diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) scavenging assay method, adapted from Brand-Williams *et al.* (1995). The extraction was performed using methanol with 1:4 proportion and stored at 4 °C for 24 h, after that, the extract was centrifuged (12000 rpm) for 15 minutes. The absorbance of the samples was measured at 517 nm and the antioxidant activity was expressed as g of Trolox.Kg⁻¹ of fresh plant.

The total phenolic content of the plant *P. aculeata* was determined by Folin-Ciocalteu method, adapted from Singleton & Rossi (1965). The time of extraction was 2 h, using methanol in the proportion 1:10 and stirring every 15 minutes. The results were expressed as g of galic acid equivalent (GAE) per kg⁻¹ of fresh plant.

The protein was estimated using the microkjeldahl method, according to the AOAC (1995). Was used the value 6.25 to convert nitrogen into protein.

Statistical Analysis

All analyzes were performed in triplicate. The data obtained in all the physicochemical evaluations for every month were compiled into graphs and analyzed using the SigmaPlot 10.0 software. The Person's correlation was performed using the Statistical Analysis Software (SAS) for Windows V8, and was considered 5 % of significance ($p < 0.05$).

RESULTS AND DISCUSSION

It is possible to cultivate *Pereskia aculeata* in temperate and humid areas. However is important to consider that the plant during the winter, when exposed to low temperatures and frost, loses leaves and stays in a quiescent state. Quiescence is a common state in seeds, but it can occur also in the entire plant or in parts of the plant. Normally, quiescence is a preparation for winter and is a strategy to conserve energy and carbohydrate by restraining growth (Forbes & Watson, 1992; Luo *et al.*, 2011). Because the quiescent state, we only had enough leaves to analyze among the months of December of 2012 to June of 2013.

Phenology is the study of the cycling of biological events throughout the year. The cycling of phenological events such as flowering, fructification, bird

migration, or animal reproduction is frequently used to define annual seasonal sequences (Bradley *et al.*, 1999). In our study we have analyzed the occurrence of new leaves, flowering and fructification (Table 1).

Table 1. Temperature, precipitation and phenological aspects during *Pereskia aculeata* cultivation between the months December of 2012 and June of 2013. Pelotas, UFPel, 2013.

Month	Temperature (°C)		Precipitation (mm)	Phenological aspects
	Min	Max		
December	13.1	39.2	133.4	New leaves
January	10.8	31.8	142.1	-
February	14.0	33.3	177.3	-
March	9.6	31.0	109.0	Starts Flowering
April	7.3	29.0	133.6	Flowering and Fruiting
May	2.5	26.0	113.9	Flowering and Fruiting
June	3.8	24.5	112.7	Starts Quiescence

Source: Centro Estadual de Meteorologia - Boletim Meteorológico do Estado do Rio Grande do Sul

Observations were made at the end of the spring, on December, when the temperature was higher, frost subsided, and the new leaves started to grow back. After two months, on February, we noticed the flowering had started in the first plants, and one month later, on March, the fruiting started. And again, when the temperature decreased, on June, the leaves started to fall, ending the cycle of the *P. aculeata* in south Brazil. Temperature and light were found to be essential factors for growth and development in this plant. It is known that temperature affects photosynthesis and the development of shoots (Shin *et al.*, 2001).

In temperate climates, warm temperatures often act as flowering triggers. Also, the rain is an important timer for flowering in shrubs. There is difference between fruiting in temperate and tropical areas. In temperate regions fruiting normally starts late in the summer or in the autumn, lasting for one and a half month in average. The fruit production is largely controlled by the accumulation of enough photosynthesis, which can only occur towards the end of the growing season (Fenner, 1998). In our study we observed that the temperature was the most important factor for flowering. Also, the fruiting started in the autumn, lasting for

two months in average. A single-year study was sufficient to demonstrate the ability of *P. aculeata* to grow under temperate and humid climate, but cannot provide complete information in the climate changes among the years. According to Fenner (1998), long-term (over a 3-5 year) investigation is required to determine phenological modifications accurately (Fenner, 1998).

The color, expressed as lightness and Hue angle, is showed in Fig. 1. The lightness presented the higher level in March ($L = 51.32$), meaning that was the month when the leaves had the lightest colors, coinciding when the flowering started. The values of Hue angle showed that the leaves presented colors between yellow and green during all the months. In December and March the leaves were more yellowish and in January more greenish. Color is an important quality attribute in appearance, processing, and acceptability of food. (Ahmed *et al.*, 2006). Chlorophyll is the most common pigment found in plants and is responsible for their characteristic green color. The bright green color of vegetables is often associated to their freshness (Calvano *et al.*, 2015).

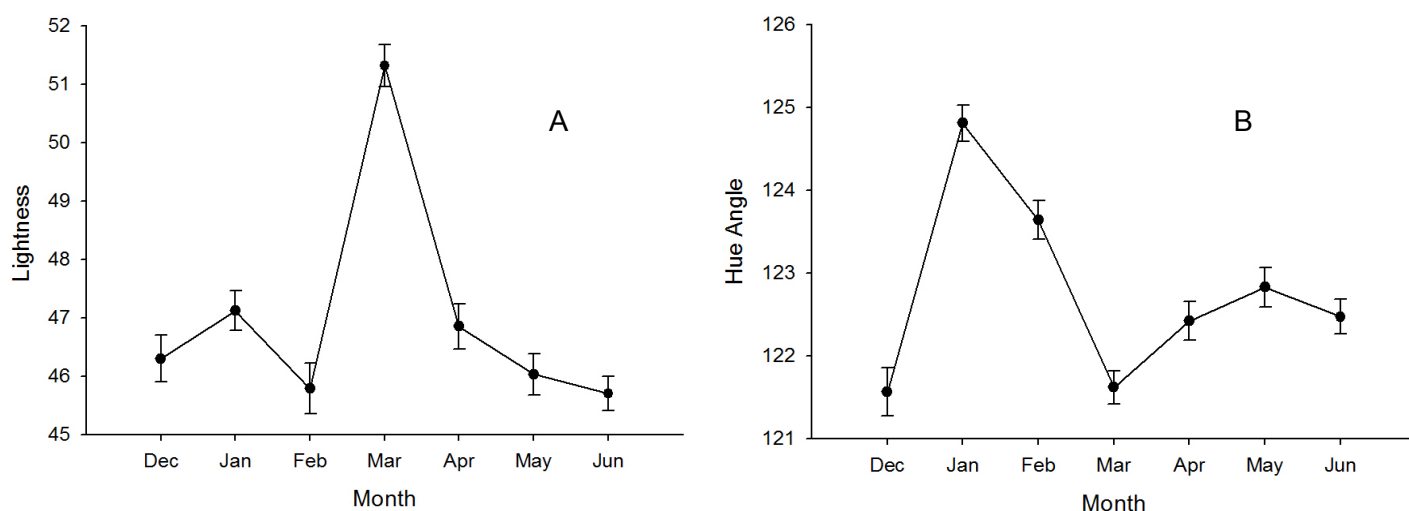


Figure 1. Color, expressed in lightness and Hue angle, of *Pereskia aculeata* leaves during December of 2012 and June of 2013.

The average height of the plants increased almost 4 folds during the seven months period of analyzes. The least average leaf area (14.82 cm^2) was observed on December, due to the quiescence state period that happened few months before. After that the leaves started to grow, reaching the largest average size (33.11 cm^2)

on February (Fig. 2). Monitoring the changes of leaf area is important for assessing growth and vigor of plants. Frost, storm, defoliation, drought, and management practice commonly cause reduction in leaf area, therefore decreasing the productivity of the plant (Breâda, 2003).

The humidity of the *P. aculeata* leaves remained around 880 g.kg⁻¹ for 7 months, reaching the lowest average value (861.11 g.kg⁻¹) on February. The protein content was higher in December of 2012 (27.23 g.kg⁻¹) and June of 2013 (27.22 g.kg⁻¹) and lower in February (21.35 g.kg⁻¹), when started the flowering (Fig. 2). Silveira & Machado (1990) studying rice plants found that the total nitrogen content in rice leaves increased until 13 days after the flowering and then decreases until the grains completed the maturation process. In the current study we did not observe the same of Silveira & Machado (1990), as the *P. aculeata* protein content decreased when the flowering started and then increased again after flowering.

The antioxidant activity, measured with the DPPH scavenging assay, as well the total phenolic content, reached the highest level, 44.99 g of Trolox . kg⁻¹ plant and 2.66 g of GAE . kg⁻¹ of plant, respectively, on April (Fig. 2). The antioxidant activity and the total phenolic content seem to be correlated ($r = 0.71$; $p < 0.0001$).

Pinto *et al.* (2012) researching *P. aculeata* leaves found, by thin layer chromatography, that phenol was the main antioxidant compound. There are many studies showing that total phenol compound has the stronger positive correlation with antioxidant activity in vegetables (Aires *et al.*, 2011; Bhandari & Kwak, 2015). Phenolic compounds are among the most important components on the quality of the vegetables and fruits. They contribute to organoleptic characteristics like color and taste and promote beneficial effect to human health (Sancho *et al.*, 2011; Zielinski *et al.*, 2014).

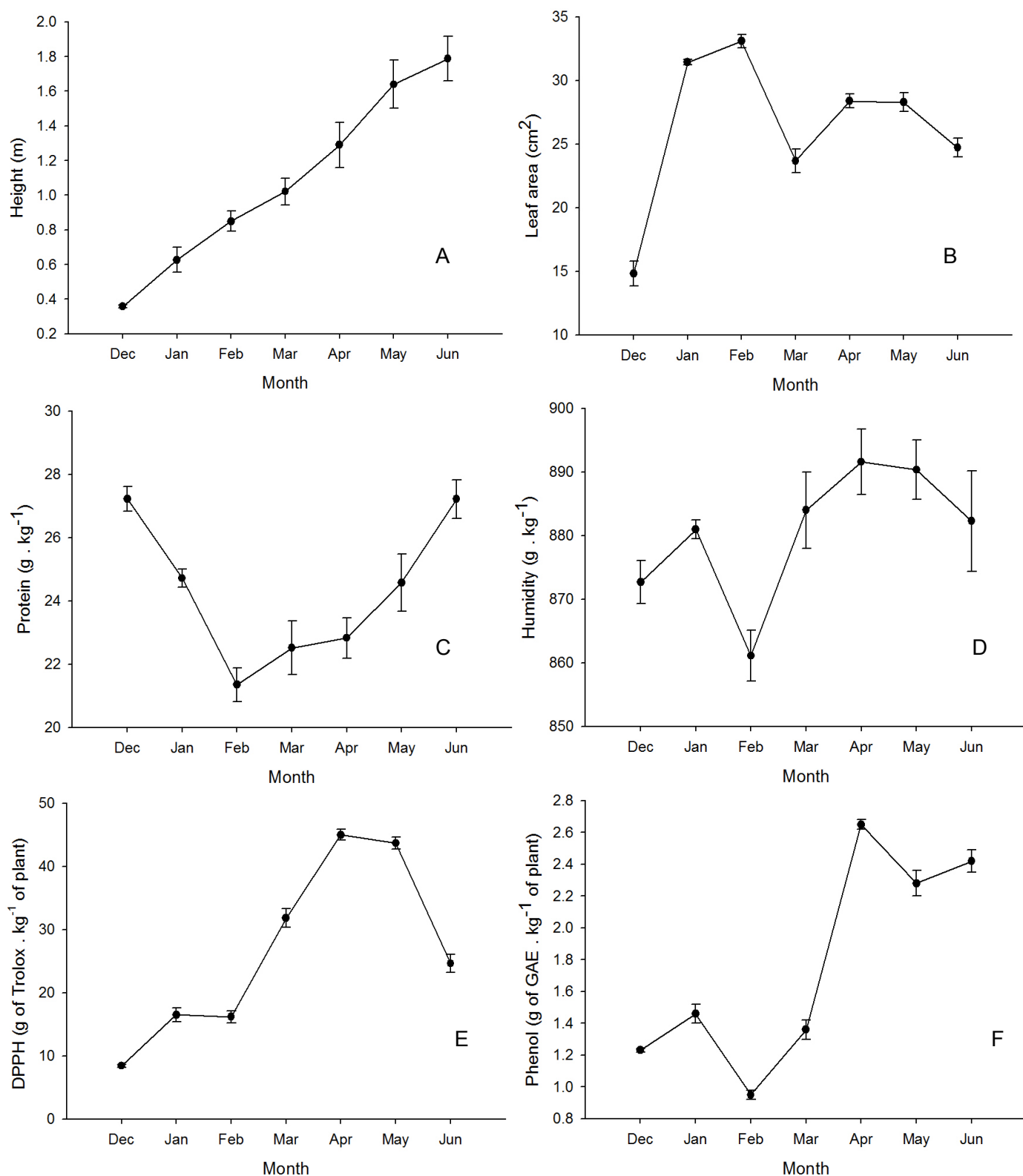


Figure 2. *Pereskia aculeata* during cultivation in Southern Brazil (December of 2012 to June of 2013). (A) height, (B) leaf area, (C) protein, (D) humidity, (E) antioxidant activity, (DPPH), and (F) total phenolic content (phenol).

Concluding, *P. aculeata* developed adequately, but with a quiescent state in the winter (without producing leaves). The flowering of the plant started on February and the fructification started one month later. The physicochemical characteristics (humidity, leaf area, protein, color, total phenolic content and antioxidant activity) varied throughout the period of cultivation. All our findings support that cultivation of *P. aculeata* for production of leaves is feasible under temperate and humid climate in south Brazil.

ACKNOWLEDGEMENTS

The authors acknowledge the FAPERGS and CAPES, for funding this work, and the EMBRAPA for supplying the plants, all from Brazilian Government.

REFERENCES

- AHMED J; KAUR A; SHIVHARE U. 2006. Color Degradation Kinetics of Spinach, Mustard Leaves, and Mixed Puree. *Journal of Food Science* 67 (3): 1088-1091.
- AIRES A; FERNANDES C; CARVALHO R; BENNET RN; SAAVEDRA MJ; ROSA EA. 2011. Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important Brassica vegetables. *Molecules* 16: 6816–6832.
- AOAC - Association of Official Analytical Chemists. 1995. *Official Methods of Analysis*. Washington, DC: AOAC. 1094p.
- BHANDARI SR; KWAK JH. 2015. Chemical Composition and Antioxidant Activity in Different Tissues of Brassica Vegetables. *Molecules* 20: 1228-1243.
- BRADLEY NL; LEOPOLD AC; ROSS J; HUFFAKER W. 1999. Phenological changes reflect climate change in Wisconsin. *Ecology* 96: 9701-9704.
- BRAND-WILLIAMS W; CUVELIER ME; BERSET C. 1995. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie* 28: 25-30.

- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2010. *Manual de Hortaliças não-convencionais*. Available in: <http://www.abcsem.com.br/docs/manual_hortalicas_web.pdf>. Access in: March 5, 2013
- BREÂDA NJJ. 2003. Ground-based measurements of leaf area index: a review of methods, instruments and current controversies. *Journal of Experimental Botany* 54 (392): 2403-2417.
- CALVANO CD; VENTURA G; CATALDI TR; PALMISANO F. 2015. Improvement of chlorophyll identification in foodstuffs by MALDI ToF/ToF mass spectrometry using 1,5-diaminonaphthalene electron transfer secondary reaction matrix. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* 407(21): 6369-6379.
- CIE – Commission Internationale de L'Eclairage. 2004. *Colorimetry*. Washington, DC: CIE. 72p.
- FENNER M. 1998. The phenology of growth and reproduction in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics* 1 (1): 78–91.
- FORBES JC; WATSON D. 1992. *Plants in Agriculture*. Cambridge: University Press. 357p.
- LUO FL; NAGEL KA; SCHARR H; ZENG B; SCHURR U; MATSUBARA S. 2011. Recovery dynamics of growth, photosynthesis and carbohydrate accumulation after de-submergence: a comparison between two wetland plants showing escape and quiescence strategies. *Annals of Botany* 107 (1): 49-63.
- MARQUES MCM; OLIVEIRA PEAM. 2004. Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas Florestas de Restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. *Revista Brasileira de Botânica* 27 (4): 713-723.

- OLIVEIRA DCS; WOBETO C; ZANUZO MR; SEVERGNINI C. 2013. Composição mineral e teor de ácido ascórbico nas folhas de quatro espécies olerícolas não-convencionais. *Horticultura Brasileira* 31 (3): 472-475.
- PINTO CCP; SANTOS RC; MACHADO DC; FLORÊNCIO JR; FAGUNDES EMS; ANTINARELLI LMR; COIMBRA ES; RIBEIRO A; SCIO E. 2012. Cytotoxic and antioxidant activity of *Pereskia aculeata* Miller. *Pharmacology Online* 3: 63-69.
- ROCHA DRC; PEREIRA JÚNIOR GA; VIEIRA G; PANTOJA L; SANTOS AS; PINTO NAVD. 2008. Macarrão adicionado de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. *Alimentos e Nutrição* 19 (4): 459-465.
- SANCHO LEGG; YAHIA EM; GONZÁLEZ-AGUILAR GA. 2011. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS- ESI. *Food Research International* 44 (5): 1284–1291.
- SARTOR CFP; AMARAL V; GUIMARÃES HET; BARROS KN; FELIPE DF; CORTEZ LER; VELTRINI VC. 2010. Estudo da Ação Cicatrizante das Folhas de *Pereskia Aculeata*. *Saúde e Pesquisa* 3 (2): 149-154.
- SHARIF KM; RAHMAN MM; ZAIDUL ISM; JANNATUL A; AKANDA MJH; MOHAMED A; SHAMSUDIN SH. 2013. Pharmacological Relevance of Primitive Leafy Cactuses *Pereskia*. *Research Journal of Biotechnology* 8 (12): 134-142.
- SHIN HK; LIETH JH; KIM SH. 2001. Effects of temperature on leaf area and flower size in rose. *Acta Horticulturae* 547: 185-191.
- SILVEIRA JAG; MACHADO EC. 1990. Mobilização de Nitrogênio e de carboidratos durante o desenvolvimento de panículas de duas cultivares de arroz. *Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal* 2 (2): 37-46.

SINGLETON VL; ROSSI JAJR. 1965. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture* 16: 144-158.

TAKEITI CY; ANTONIO GC; MOTTA EMP; COLLARES-QUEIROZ FP; PARK KJ. 2009. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *International Journal of Food Sciences and Nutrition* 60: 148-160.

TAVARES-JÚNIOR JE; FAVARIN JL; DOURADO-NETO D; MAIA AHN; FAZUOLI LC; BERNARDES MS. 2002. Análise comparativa de métodos de estimativa de área foliar em cafeeiro. *Bragantia* 61 (2): 199-203.

USDA - United States Department of Agriculture. *National nutrient database for standard reference release 27*. Available in:
<<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>> access in: April 26, 2014.

ZIELINSKI AA; ÁVILA S; ITO V; NOGUEIRA A; WOSIACKI G; HAMINIUK CW. 2014. The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and in vitro antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: An application of chemometrics. *Journal of Food Science* 79 (4), 510–516.

7 Considerações Finais

O potencial alimentar da planta *Pereskia aculeata*, devido aos elevados teores de minerais, aminoácidos, vitaminas, fenóis, fibras e antioxidantes, é reconhecido pela comunidade científica.

Os resultados mostram que essa planta não possui efeito tóxico em ratos na dose de até 5000 mg/kg de massa corporal, sendo classificada no menor nível de toxicidade pela OECD.

Além disso, *Pereskia aculeata* não apresentou efeitos citotóxicos relevantes em sementes de alface (*Lactuca sativa*), exceto por modificação discreta no crescimento de raízes e partes aéreas, porém sem alteração na germinação e sem efeito genotóxico.

O cultivo da *Pereskia aculeata* em regiões de clima temperado é possível, porém deve-se considerar o período de quiescência que ocorre durante o inverno, no qual a planta não produz folhas. Os resultados das análises físico-químicas evidenciaram grande variação na composição da planta ao longo do cultivo.

Sugere-se a realização de estudos complementares para avaliar a toxicidade crônica da planta *Pereskia aculeata* e seu potencial produtivo em anos com características climáticas distintas.

REFERÊNCIAS

2ª CONFERÊNCIA NACIONAL DE SEGURANÇA ALIMENTAR E NUTRICIONAL. Carta de Olinda, Olinda, 48 p, 2004.

AHMED, J.; KAUR, A.; SHIVHARE, U. Color Degradation Kinetics of Spinach, Mustard Leaves, and Mixed Puree. **Journal of Food Science**, v. 67, n.3, p. 1088-1091, 2006.

AIRES, A.; FERNANDES, C.; CARVALHO, R.; BENNETT, R. N.; SAAVEDRA, M. J.; ROSA, E. A. Seasonal effects on bioactive compounds and antioxidant capacity of six economically important Brassica vegetables. **Molecules**, v.16, p. 6816–6832, 2011.

ALBAYIT, S. F. A.; ABBA, Y.; ABDULLAH, R.; ABDULLAH, N. Evaluation of Antioxidant Activity and Acute Toxicity of Clausena excavata Leaves Extract. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2014, p. 1-10, 2014.

ALMEIDA, M. E. F.; CORREA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero Pereskia na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, v. 42, n. 4, p. 751-756, 2012.

ALMEIDA, M. E. F.; JUNQUEIRA, A. M. B.; SIMÃO, A. A.; CORRÊA A. D. Caracterização química das hortaliças não-convencionais conhecidas como ora-pro-nobis. **Bioscience Journal**, v. 30, n. 1, p. 431-439, 2014.

AMDUR, M. O.; DOULL, J.; KLAASEN, C. D. **Casarett and Doull's Toxicology**: The basic science of poison. 7.ed. New York: Pergamon Press, 1996. 1296 p.

AOAC - Association of Official Analytical Chemists. **Official Methods of Analysis**. Washington, DC: AOAC, 1995. 1094 p.

BAILEY, S.A.; ZIDELL, R.H.; PERRY, R.W. Relationships between organ weight and body/brain weight in the rat: What is the best analytical endpoint? **Toxicologic Pathology**, v. 32, n. 4, p. 448-466, 2004.

BARBALHO, S. M.; GUIGUER, E.L.; MARINELLI, P.S.; BUENO, P.C.S.; PESPININI-SALZEDAS, L.M.; DOS SANTOS, M.C.B.; OSHIWA, M.;

MENDES, C.G.; DE MENEZES, M.L.; NICOLAU, C.C.T.; OTOBONI, A.M.; GOULART, R.A. *Pereskia aculeata* Miller Flour: Metabolic Effects and Composition. **Journal of Medicinal Food**, v. 19, n. 9, p. 890-894, 2016.

BENEVIDES, C. M. J.; SOUZA, M. V.; SOUZA, R. D. B.; LOPES, M. V. Fatores antinutricionais em alimentos: revisão. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, n. 2, p. 67-79, 2011.

BERSET, C.; BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **University of technology**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BHANDARI, S. R; KWAK, J. H. Chemical Composition and Antioxidant Activity in Different Tissues of Brassica Vegetables. **Molecules**, v. 20, p. 1228-1243, 2015.

BLOEM, M. W.; SEMBA, R. D.; KRAEMER, K. Castel Gandolfo Workshop: An Introduction to the Impact of Climate Change, the Economic Crisis, and the Increase in the Food Prices on Malnutrition. **Journal of Nutrition**, v. 140, p. 132S–135S, 2010.

BRADLEY, N. L.; LEOPOLD, A. C.; ROSS, J.; HUFFAKER, W. Phenological changes reflect climate change in Wisconsin. **Ecology**, v. 96, p. 9701-9704, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, p. 25-30, 1995.

BRASIL. Resolução RE no. 90 de 16.03.2004. **Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos**. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Ministério da Saúde. Brasil. 2004. Disponível em <www.anvisa.gov.br/medicamentos/registro/legis.htm> Acesso em: 24 Mar. 2013.

BRASIL, Lei 11.947 de 16 de Junho de 2009. **As Novas Diretrizes do Programa Nacional de Alimentação Escolar**. Brasília, 2009.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Hortaliças não-convencionais**. Brasília, DF, 2010. Disponível em:

<http://www.abcsem.com.br/docs/manual_hortalicas_web.pdf>. Acesso em: 20 Mar. 2014

BREÂDA, N. J. J. Ground-based measurements of leaf area index: a review of methods, instruments and current controversies. **Journal of Experimental Botany**, v. 54, n. 392, p. 2403-2417, 2003.

CALVANO, C. D.; VENTURA, G.; CATALDI, T. R.; PALMISANO, F. Improvement of chlorophyll identification in foodstuffs by MALDI ToF/ToF mass spectrometry using 1,5-diaminonaphthalene electron transfer secondary reaction matrix. **Analytical and Bioanalytical Chemistry**, v. 407, n. 21, p. 6369-6379, 2015.

CARVALHO, M. R. B.; KIRSCHNIK, P. G.; PAIVA, K. C.; AIURA, F. S. Avaliação da atividade dos inibidores de tripsina após digestão enzimática em grãos de soja tratados termicamente. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 267-272, 2002.

CIE – Commission Internationale de L'Eclairage. **Colorimetry**. Washington, DC: CIE. 2004. 72p.

CHENG, F.; CHENG, Z: Research Progress on the use of Plant Allelopathy in Agriculture and the Physiological and Ecological Mechanisms of Allelopathy. **Frontiers in Plant Science**, v. 6 (1020), 2015.

CRQ – Conselho Regional de Química IV Região. **Conceitos Fundamentais de HPLC**, 2010. Disponível em: <http://www.crq4.org.br/sms/files/file/conceitos_hplc_2010.pdf> Acesso em: 26 Janeiro 2015.

DECIDA-CAMPOS, M.; RIVERO-CRUZ, I.; ARRIAGA-ALBA, M.; CASTANEDA-CORRAL, G.; ANGELES-LOPEZ, G. E.; NAVARRETE, A.; MATA, R. Acute toxicity and mutagenic activity of Mexican plants used in traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, p. 334-342, 2007.

DELARMELINA, J.M.; BATITUCCI, M.C.P.; GONCALVES, J.L.O. Efeitos citotóxico, genotóxico e mutagênico da tintura de *Matricaria chamomilla* L. in vivo. **Revista Cubana de Plantas Medicinales**, v. 17, n. 2, p. 149-159, 2012.

DOETSCH, P. W.; CASSADY, J. M.; MCLAUGHLIN, J. L. Cactus Alkaloids: XL Identification of mescalina and other β -Phenetyl-amines in Pereskia, Pereskopsis and Islaya by se of fluorescamine conjugates. **Journal of Chromatography**, v. 189, p.79-85, 1980.

EMA - EUROPEAN MEDICINES AGENCY. **Note for Guidance on the Pre-Clinical Evaluation of Anticancer Medicinal Products**. 1998.

Disponível em:

<<http://www.emea.europa.eu/pdfs/human/swp/099796en.pdf>> Acesso em: 02 dez. 2012.

FAO - Food and Agriculture Organization of the United Nations. **The State of Food and Agriculture**. 1 ed. Roma, 2011. 160 p.

FDA - FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. **Guidance for Industry - Single Dose Acute Toxicity for Pharmaceuticals**. 1996. Disponível em: <<http://www.fda.gov/downloads/Drugs/GuidanceComplianceRegulatoryInformation/Guidances/UCM079270.pdf>> Acesso em: 20 mai. 2014.

FENNER, M. The phenology of growth and reproduction in plants.

Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics, v. 1, n.1, p. 78–91,1998.

FERREIRA, A. G.; AQUILA, M. E. A. Alelopatia: uma área emergente da ecofisiologia vegetal. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 12, n. 1, p. 175-204, 2000.

FERREIRA, A. G.; BORGHETTI, F. **Germinação**: do básico ao aplicado. Porto Alegre: Artmed; 2004. 323 p.

FILANNINO, P.; CAVOSKI, I.; THLIEN, N. VINCENTINI, O.; ANGELIS, M.; SILANO, M.; GOBBETTI, M.; CAGNO, R. Lactic Acid Fermentation of Cactus Cladodes (*Opuntia ficus-indica* L.) Generates Flavonoid Derivatives with Antioxidant and Anti-Inflammatory Properties. **PLoS ONE**, v. 11, n. 3, 2016.

FORBES, J. C.; WATSON, D. **Plants in Agriculture**. Cambridge: University Press; 1992. 357 p.

GLEW, R.H.; GLEW, R.S.; CHUANG, L.T.; HUANG, Y.S.; MILLSON, M.; CONSTANS, D.; VANDERJAGT, D.J. Amino acid, mineral and fatty acid

content of pumpkin seeds (*Cucurbita* spp) and *Cyperus esculentus* nuts in the Republic of Niger. **Plant Foods for Human Nutrition**, v., 61, n. 2, p. 51-56, 2006.

GORNALL, J.; BETTS, R.; BURKE, E.; CLARK, R.; CAMP, J.; WILLETT, K.; WILTSHIRE, A. Implications of climate change for agricultural productivity in the early twenty-first century. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, p. 2973-2989, 2010.

GUERRA, M. High amount of heterochromatin in a tropical tree species: *Genipa americana* L. (Rubiaceae). **Cytologia**, v. 58, p. 427- 32, 1993.

HOR, S. Y.; AHMAD, M.; FARSI, E.; YAM, M. F.; HASHIM, M. A.; LIM, C. P.; SADIKUN, A.; ASMAWI, M. Z. Safety assessment of methanol extract of red dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*): Acute and subchronic toxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 63, p. 106-114, 2012.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística – **Pesquisa Nacional por Amostra de Domicílios, Segurança Alimentar 2004/2009**. Rio de Janeiro, 2010.

JIMENEZ-ASPEE, F.; ALBERTO, M.R.; QUISPE, C.; SORIANO MDEL, P.; THEODULOZ, C.; ZAMPINI, I.C.; ISLA, M.I.; SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. Anti-inflammatory activity of copao (*Eulychnia acida* Phil., *Cactaceae*) fruits. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 70, n. 2, p. 135-140, 2015.

JOHNSON, L. L.; STEHR, C. M.; OLSON, O. P.; MYERS, M. S.; PIERCE, S. M.; WIGREN, C. A; MCCAIN, B. B.; VARANASI, U. Chemical contaminants and hepatic lesions in winter flounder (*Pleuronectes americanus*) from the Northeast Coast of the United States. **Environmental Science & Technology**, v. 27, n. 13, p. 2759–2771, 1993.

KAISER, C. R. RMN 2D: Detecção inversa e gradiente de campo na determinação estrutural de compostos orgânicos. **Química Nova**, v. 23, n. 2, p. 231-236, 2000.

KAZAMA, C. C.; UCHIDA, D. T.; CANZI, K. N.; SOUZA, P.; CRESTANI, S.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; LAVERDE JUNIOR, A. Involvement of arginine-vasopressin in the diuretic and hypotensive effects of *Pereskia grandifolia* Haw (Cactaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 144, p. 86–93, 2012.

KINUPP, V. F. **Plantas alimentícias não-Convencionais da região metropolitana de Porto Alegre, RS**. 2007. 590f. Tese (Doutorado em Fitotecnia) Faculdade de Agronomia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre.

KINUPP, V.; BARROS, I. Teores de proteína e minerais de espécies nativas, potenciais hortaliças e frutas. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 4, p. 846-857, 2008.

LÁSZTITY, R.; HIDVÉGI, M.; BATA, A. Saponins in food. **Food Reviews International**, v. 14, n. 4, p. 371-90, 1998.

LOPES, M. I. L.; SAFFIA, J.; ECHEVERRIGARAYA, S.; HENRIQUESA J. A. P.; SALVADORA, M. Mutagenic and antioxidant activities of *Croton lechleri* sap in biological systems. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 437–445, 2004.

LUBINI, G.; FACHINETTO, J.M.; LAUGHINGHOUSE, H.D.; PARANHOS, J.T.; SILVA, A.C.F.; TEDESCO S.B. Extracts affecting mitotic division in root-tip meristematic cells. **Biologia**, v. 63, n. 5, :p. 647-651, 2008.

LUO, F. L.; NAGEL, K. A.; SCHARR, H.; ZENG, B.; SCHURR, U.; MATSUBARA, S. Recovery dynamics of growth, photosynthesis and carbohydrate accumulation after de-submergence: a comparison between two wetland plants showing escape and quiescence strategies. **Annals of Botany**, v. 107, n. 1, p. 49–63, 2011.

MARQUES, M. C. M.; OLIVEIRA, P. E. A .M. Fenologia de espécies do dossel e do sub-bosque de duas Florestas de Restinga na Ilha do Mel, sul do Brasil. **Revista Brasileira de Botânica**, v. 27, n. 4, p. 713-723, 2004.

MCMANUS, J. G. A.; MOWRY, R. W. **Staining Methods**: Histological and Histochemical, Harper & Row. New York, 1984.

MORAN-RAMOS, S.; AVILA-NAVA, A.; TOVAR, A. R.; PEDRAZA-CHAVERRI, J.; LOPEZ-ROMERO, P.; TORRES, N. Opuntia ficus indica (Nopal) Attenuates Hepatic Steatosis and Oxidative Stress in Obese Zucker (fa/fa) Rats. **Journal of Nutrition**, v. 142, p. 1956–1963, 2012.

MURRAY, R. K. **Bioquímica Ilustrada de Harper**. 29. Ed. Porto Alegre: Artmed, 2013 a. 818p.

MURRAY, K. K.; BOYD, R. K.; EBERLIN, M. N.; LANGLEY, G. J.; LI, L.; NAITO, Y. Definitions of terms relating to mass spectrometry (IUPAC Recommendations 2013). **Pure and Applied Chemistry**, v. 85, n. 7, p. 1515–1609, 2013 b.

NACHTIGALL, A. M.; STRINGHETA, P. C.; FIDELIS, P. C.; NACHTIGALL, F. M. Determinação do teor de Luteína em hortaliças. **Boletim CEPPA**, v. 25, p. 181-192, 2007.

NELSON, D.L.; COX M.M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. New York: W.H. Freeman and Company; 2012, 6th Edition. 1340 p.

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. **Acute Oral Toxicity** – Fixed Dose Procedure. Guidelines 420. OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals, 2001. Disponível em:
<<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948362.pdf>>
Acesso em: 09 abr. 2013

OECD - Organization for Economic Co-operation and Development. **Acute Oral Toxicity**. Guidelines 425. OECD Guidelines For The Testing Of Chemicals, 2008. Disponível em:
<<http://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/fedddocs/oecd/oecd425.pdf>>
Acesso em: 12 out. 2013.

OLIVEIRA, D. C. S.; WOBETO, C.; ZANUZO, M. R.; SEVERGNINI, C. Composição mineral e teor de ácido ascórbico nas folhas de quatro espécies olerícolas não-convencionais. **Horticultura Brasileira**, v. 31, n. 3, p. 472-475, 2013.

OLIVEIRA, A. K. M.; MATIAS, R.; LOPES, S. S.; FONTOURA, F. M. Allelopathy and influence of leaves of *Palicourea rigida* (Rubiaceae) on seed germination and seedling formation in lettuce. **Bioscience Journal**, v. 30, p. 938-947, 2014.

PEREIRA, O. L., BARRETO, R. W., CAVALLAZZI, J. R. P.; BRAUN, U. The mycobiota of the cactus weed *Pereskia aculeata* in Brazil, with comments on the life-cycle of *Uromyces pereskiae*. **Fungal Diversity**, v. 25, p. 127-140, 2007.

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

PINTO, N.C.; DUQUE, A. P.; PACHECO, N. R.; MENDES, R. F.; MOTTA, E. V.; BELLOZI, P. M.; RIBEIRO, A.; SALVADOR, M. J.; SCIO, E. *Pereskia aculeata*: a planta food with antinociceptive activity. **Pharmaceutical Biology**, v. 53, n. 12, p. 1780-1785, 2015 a.

PINTO, N.C.C.; MACHADO, D.C.; SILVA, J.M.; CONEGUNDES, J.L.M.; GUALBERTO, A.C.M.; GAMEIRO, J.; CHEDIER, L.M.; CASTAÑON, M.C.M.N.; SCIO, E. *Pereskia aculeata* Miller leaves present in vivo topical anti-inflammatory activity in models of acute and chronic dermatitis. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 173, p. 330-337, 2015 b.

PIRES, N. M.; PRATES, H. T.; PEREIRA, I. A.; OLIVEIRA, R. S.; FARIA, T. C. L. Atividade alelopática da leucena sobre espécies de plantas daninhas. **Scientia Agrícola**, v. 58, n. 1, p. 61-65, 2001.

PRABU, P.C.; PANCHAPAKESAN, S; RAJ, C.D. Acute and Sub-Acute Oral Toxicity Assessment of the Hydroalcoholic Extract of *Withania somnifera* Roots in Wistar Rats. **Phytotherapy Research**, v. 27, n. 8, p. 1169-1178, 2013.

PRATES, H. T.; PAES, J. M. V.; PIRES, N. M.; PEREIRA, I. A.; MAGALHÃES, P. C. Efeito do extrato aquoso de leucena na germinação e no desenvolvimento do milho. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v.35, n.1, p. 909-914, 2001.

REIGOSA, M. J.; SÁNCHEZ-MOREIRA, A.; GONZÁLES, L. Ecophysiological approach in allelopathy. **Critical Reviews in Plant Science**, n.18, v. 5, p. 577-608, 1999.

RICE, E. L. **Allelopathy**. 2. Ed. New York: Academic Press, 1984. 422 p.

ROCHA, D. R. C.; PEREIRA JÚNIOR, G. A.; VIEIRA, G.; PANTOJA, L.; SANTOS, A. S.; PINTO, N. A. V. D. Macarrão adicionado de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. **Alimentos e Nutrição**, v.19, n. 4, p. 459-465, 2008.

RODRIGUES, F. C. M. P.; LOPES, B. M. Potencial Alelopático de *Mimosa caesalpinaefolia* Benth sobre sementes de *Tabebuia alba* (Cham.) Sandw. **Floresta e Ambiente**, v.8, n.1, p.130-136, 2001.

SANCHO, L. E. G. G.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of phenols, carotenoids, and vitamin C from papaya (*Carica papaya* L., cv. Maradol) fruit determined by HPLC-DAD-MS/MS-ESI. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1284–1291, 2011.

SANDERSON, K.; BARICCATTI, R. A.; PRIMIERI, C.; VIANA, O. H.; VIECELLI, C. A.; BLEIL JUNIOR, H. G. Allelopathic influence of the aqueous extract of jatropha on lettuce (*Lactuca sativa* var. Grand Rapids) germination and development. **Journal of Food Agriculture and Environment**, v. 11, p. 641-643, 2013.

SARTOR, C. F. P.; AMARAL, V.; GUIMARÃES, H. E. T.; BARROS, K. N.; FELIPE, D. F.; CORTEZ, L. E. R.; VELTRINI, V. C. Estudo da Ação Cicatrizante das Folhas de *Pereskia Aculeata*. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 3, n. 2, p. 149-154, 2010.

SAS Institute Inc. SAS/STAT user's guide version 6. Cary, 1990. 1022p.

SHARIF, K. M.; RAHMAN M. M.; ZAIDUL I. S. M.; JANNATUL, A.; AKANDA, M. J. H.; MOHAMED, A.; SHAMSUDIN, S. H. Pharmacological Relevance of Primitive Leafy Cactuses *Pereskia*. **Research Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 12, p.134-142, 2013.

SHETTY, A. A.; RANA, M. K.; PREETHAM, S. P. Cactus: a medicinal food. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 530-6, 2011.

SHIN, H. K.; LIETH, J. H.; KIM, S. H. Effects of temperature on leaf area and flower size in rose. **Acta Horticulturae**, v. 547, p. 185-191, 2001.

SHUSHUNOV, S.; BALASHOV, L.; KRAVTSOVA, A.; KRASNOGORSKY, I.; LATTE, K.P.; VASILIEV, A. Determination of Acute Toxicity of the Aqueous Extract of *Potentilla erecta* (Tormetil) Rhizomes in Rats and Mice. **Journal of Medicinal Food**, v. 12, n. 5, p. 1173-1176, 2009.

SILVA, D. O. **Avaliação do crescimento e desenvolvimento de ratos tratados com *Pereskia aculeata***, Miller. 2012. 66f. Dissertação (Mestrado

em Nutrição e Alimentos) - Faculdade de Nutrição da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2012.

SILVEIRA, J. A. G.; MACHADO, E. C. Mobilização de Nitrogênio e de carboidratos durante o desenvolvimento de panículas de duas cultivares de arroz. **Revista Brasileira de Fisiologia Vegetal**, v. 2, n. 2, p. 37-46, 1990.

SIM, K. S.; NURESTRI, A. M. S.; SINNIH, S. K.; KIM, K. H.; NORHANOM, A. W. Acute oral toxicity of *Pereskia bleo* and *Pereskia grandifolia* in mice. **Pharmacognosy Magazine**, v. 6, p. 67-70, 2010.

SINGLETON, V. L.; ROSSI, J. A. J. R. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, v. 16, p. 144-158, 1965.

SOUSA, S.M.; SILVA, P.S.; VICCINI, L.F. Cytogenotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf (lemon grass) aqueous extracts in vegetal test systems. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 82, p. 305-311, 2010.

SOUZA, P. A.; SOUZA, H. B. A.; SANTOS, J. E.; FREITAS, O. Avaliação físico-química e nutricional de grãos de feijão guandu (*Cajanus cajan*) (L) Millsp). **Alimentação e Nutrição**, v. 3, p. 51-62, 1991.

SOUZA, S. A. M.; CATTELAN, L. V.; VARGAS, D. P.; PIANA, C. F. B.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B.H.G. Atividade alelopática e citotóxica do extrato aquoso de espinheira-santa (*Maytenus ilicifolia* Mart. Ex reiss.). **Publicatio UEPG Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 11, n. 3, p. 7-14, 2005 a.

SOUZA, S. A. M.; STEIN, V. C.; CATTELAN, L. V.; BOBROWSKI, V. L.; ROCHA, B. H. G. Utilização de sementes de alface e de rúcula como ensaios biológicos para avaliação do efeito citotóxico e alelopático de extratos aquosos de plantas medicinais. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. v. 5, n. 1, p. 3-9, 2005 b.

SOUZA, M. R. M.; CORREA, E. J. A; GUIMARÃES, G.; PEREIRA, P. R. G. O potencial do ora-pro-nobis na diversificação da produção agrícola familiar. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v.4, n.2, p.3550-3554, 2009.

SOUZA, T. C. L. **Perfil de compostos fenólicos extraídos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller)**. 2014. 84f. Dissertação

(Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2014 a.

SOUZA, L.F.; DE BARROS, I.B.; MANCINI, E.; DE MARTINO, L.; SCANDOLERA, E.; DE FEO, V. Chemical composition and biological activities of the essential oils from two *Pereskia* species grown in Brazil. **Natural Product Communications**, v. 9, p. 1805–1808, 2014 b.

SOUZA, L.F.; CAPUTO, L.; DE BARROS, I.B.I; FRATIANNI, F.; NAZZARO, F.; DE FEO, V. *Pereskia aculeata* Muller (Cactaceae) Leaves: Chemical Composition and Biological Activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, p. 1478-1490, 2016.

STRZEPEK, K.; BOEHLERT, B. Competition for water for the food system. **Philosophical Transactions of the Royal Society B**, v. 365, n.1554, p. 2927-2940, 2010.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** / NEPA – UNICAMP. 2. Ed. Campinas, 2006. 113p.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; PARK, K.J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**. v. 60, p. 148-160, 2009.

TAVARES-JÚNIOR, J. E.; FAVARIN, J. L.; DOURADO-NETO, D.; MAIA, A. H. N.; FAZUOLI, L. C.; BERNARDES, M. S. Análise comparativa de métodos de estimativa de área foliar em cafeeiro. **Bragantia**, v. 61, n. 2, p. 199-203, 2002.

THOUNAOJAM, M.C.; JADEJA, R.N.; SANKHARI, J.M.; DEVKAR, R.V.; RAMACHANDRAN, A.V. Safety Evaluations on Ethanolic Extract of Red Cabbage (*Brassica oleracea* L.) in Mice. **Journal of Food Science**, v.76, n. 1, p. 35-39, 2011.

USDA - United States Department of Agriculture. **National nutrient database for standard reference release 27**. Disponível em: <<http://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods>> acesso em: 26 abr. 2015.

USDA - United States Department of Agriculture. Dietary Reference Intakes: **Recommended Intake for Individuals**. Disponível em:

<http://www.nal.usda.gov/fnic/DRI/DRI_Tables/estimated_average_requirements.pdf> acesso em: 5 mai. 2015

UNICEF - United Nations Children's Fund. **The State of the World's Children**. 1. Ed. Nova Iorque, 2006. 156 p.

VALENTE, L. M. M.; SCHEINVAR, L. A.; SILVA, G. C.; ANTUNES, A. P.; SANTOS, F. A. L.; OLIVEIRA, T. F.; TAPPIN, M. R. R.; NETO, F. R. A.; PEREIRA, A. S.; CARVALHAES, S. F.; SIANI, A. C.; SANTOS, R. R.; SOARES, R. O. A.; FERREIRA, E. F.; BOZZA, M.; STUTZ, C.; GIBALDI, D. Evaluation of the antitumor and trypanocidal activities and alkaloid profile in species of Brazilian Cactaceae. **Pharmacognosy Magazine**, v. 3, n. 11, p.167-172, 2007.

VIEIRA, D. A.; SANTOS, P. S.; HAMINIUK, C. W. I.; MANUEL PLATA-OVIEDO, M. S. V. Avaliação da atividade antioxidante das folhas de acerola, guabiroba e ora-pro-nobis. **Revista Brasileira de Pesquisa em Alimentos**, v.1, n.2, p.129-134, 2010.

VINCI, G.; BOTRÈ, F.; MELE, G.; RUGGIERI, G. Ascorbic acid in exotic fruits: a liquid chromatographic investigation. **Food Chemistry**, v.53, p. 211-214, 1995.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Food additives series No 50**. Safety evaluation of certain food additives. Geneva. 2003.

WRIGHT, K. H.; PIKE, O. A.; FAIRBANKS, D. J.; HUBER, C. S. Composition of *Atriplex hortensis*, Sweet and Bitter *Chenopodium quinoa* Seeds. **Food Chemistry and Toxicology**, v. 67, p.1383-1385, 2002.

ZIELINSKI, A. A.; ÁVILA, S.; ITO, V.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G.; HAMINIUK, C. W. The association between chromaticity, phenolics, carotenoids, and in vitro antioxidant activity of frozen fruit pulp in Brazil: An application of chemometrics. **Journal of Food Science**, v. 79, n. 4, p. 510–516, 2014.

APÊNDICES

Os demais resultados encontrados ao longo da pesquisa e que ainda não foram compilados na forma de artigos científicos, foram apresentados na forma de apêndices e se encontram a seguir.

Apêndice A

Identificação de composto majoritário da planta *Pereskia aculeata*

Foram realizadas análises cromatográficas do extrato metanólico de duas variedades da planta *P. aculeata*, uma com ápice com pigmentos avermelhados (acesso de Brasília - DF) e outra com ápice sem coloração (acesso de Canelinha - SC) utilizando-se o HPLC (Fig. 1 e 2). Após, realizou-se o isolamento do componente majoritário da planta *P. aculeata* variedade com ápice sem coloração, identificado na análise de HPLC (Fig. 2). Após o isolamento desse composto, executou-se as análises de HRMS (Fig. 3), UPLC-MS (Fig. 4) e RMN, ^1H , ^{13}C e Cosy, (Fig. 5) com o intuito de identificar o composto isolado.

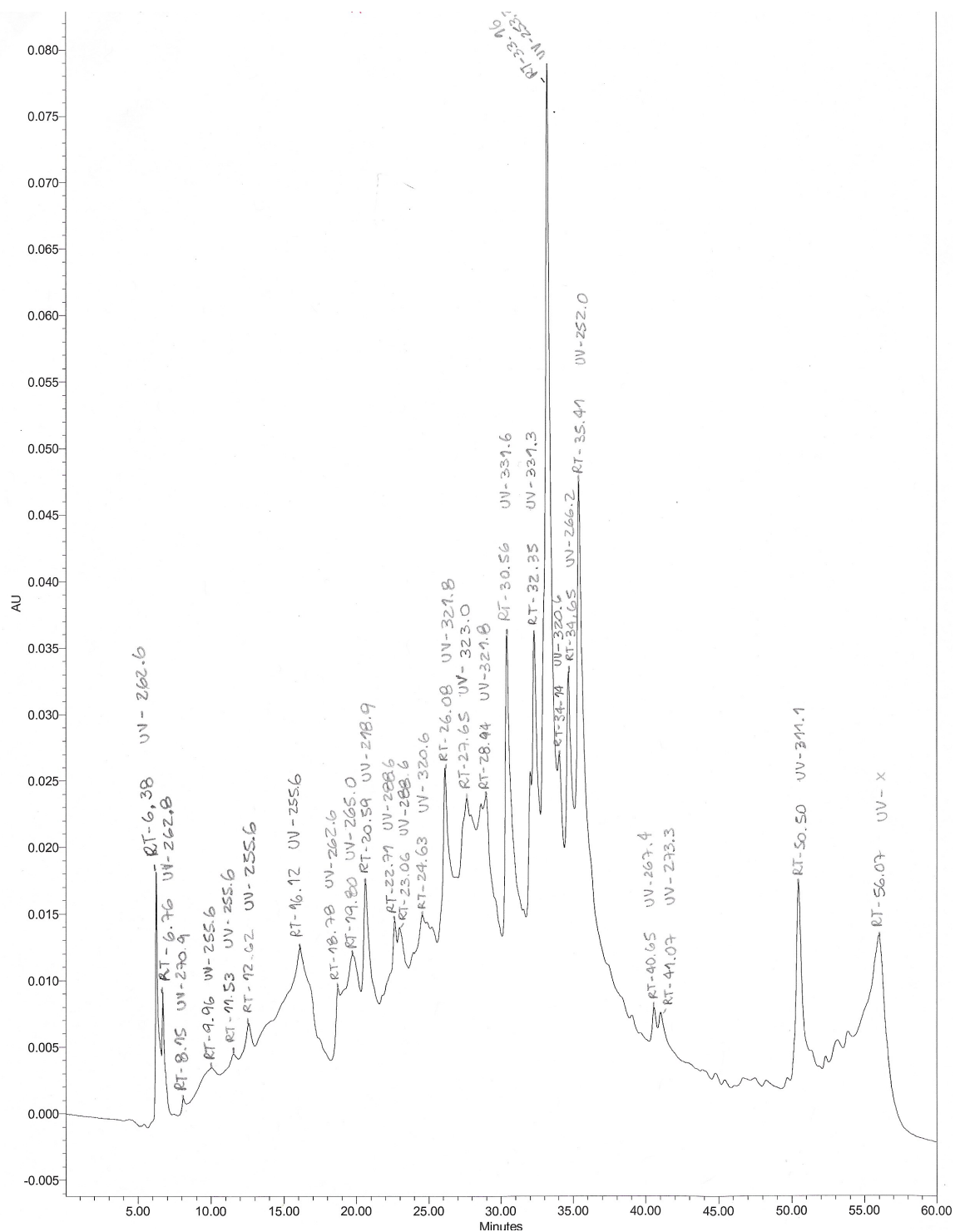


Figura 1. Cromatograma obtido por HPLC do extrato metanólico da planta *Pereskia aculeata* variedade com ápice com pigmentos avermelhados

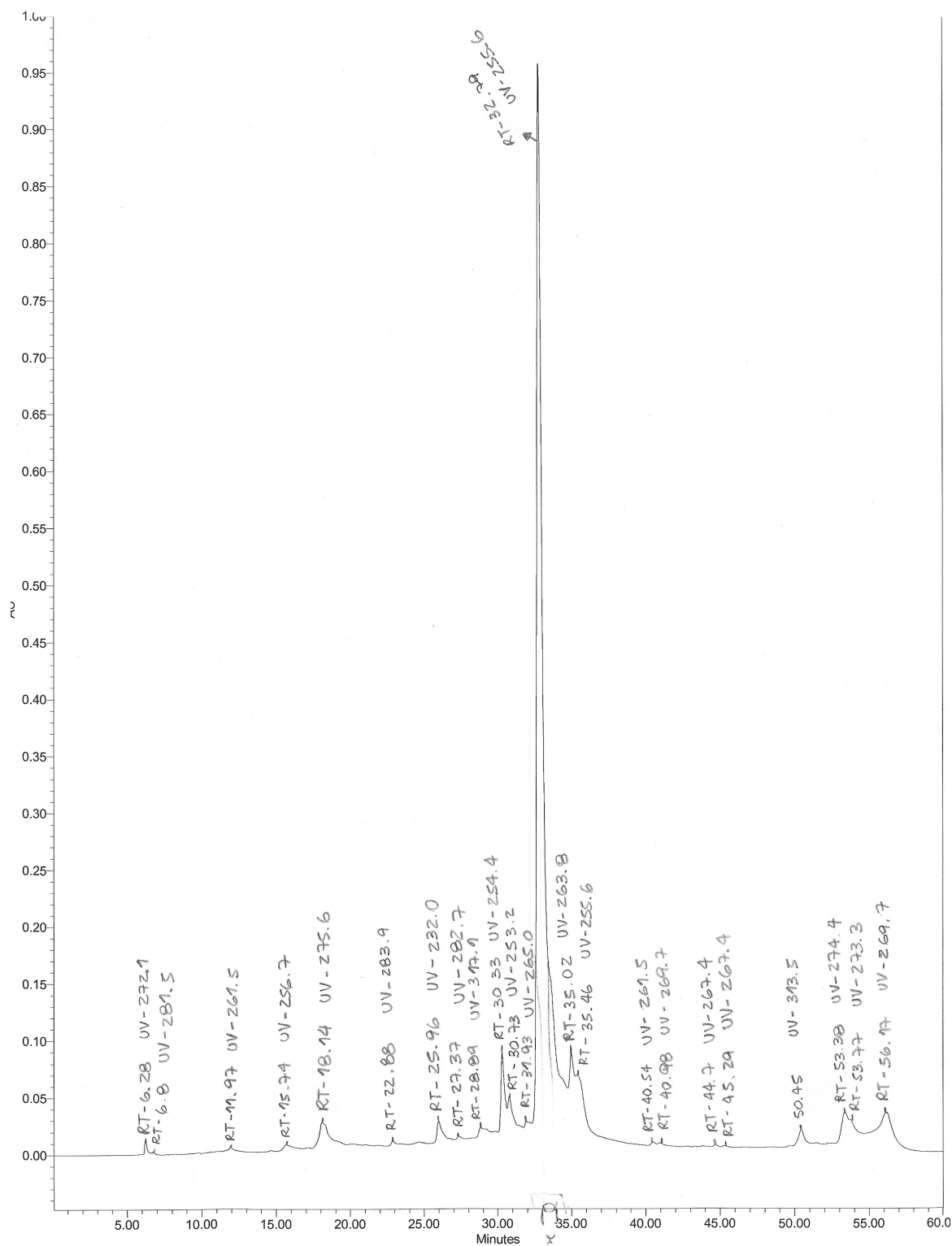


Figura 2. Cromatograma obtido por HPLC do extrato metanólico da planta *Pereskia aculeata* variedade com ápice sem coloração

4278#2 #11-22 RT: 0.12-0.24 AV: 12 NL: 3.32E6
T: FTMS + p ESI Full ms [100.00-2000.00]

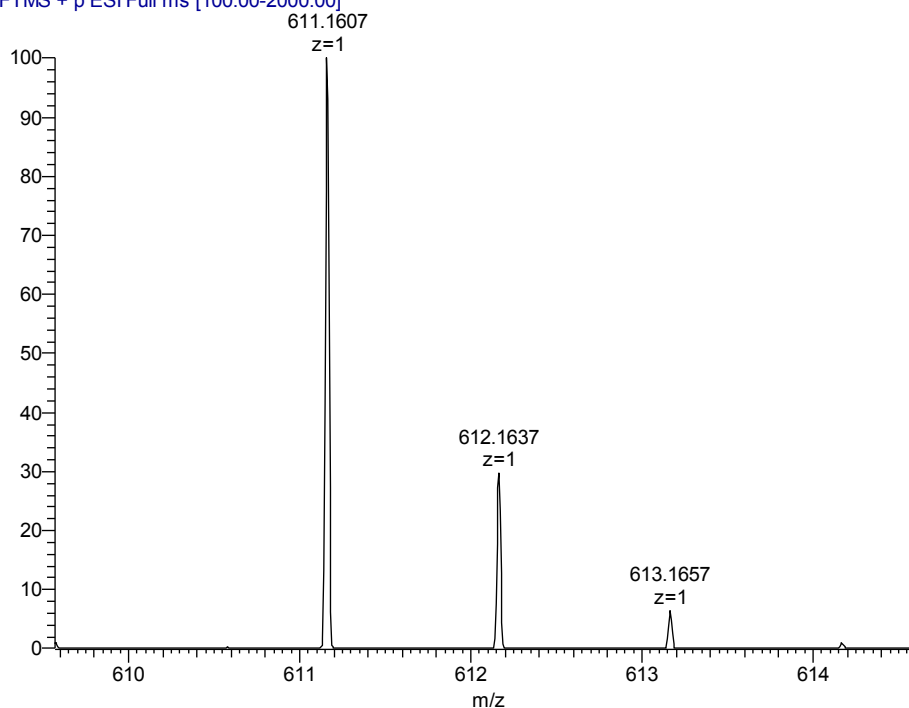


Figura 3. Espectro obtido por HRMS do extrato metanólico do composto isolado da planta *Pereskia aculeata* variedade com ápice sem coloração. Identificação da massa molecular do composto: 611.16 Dalton

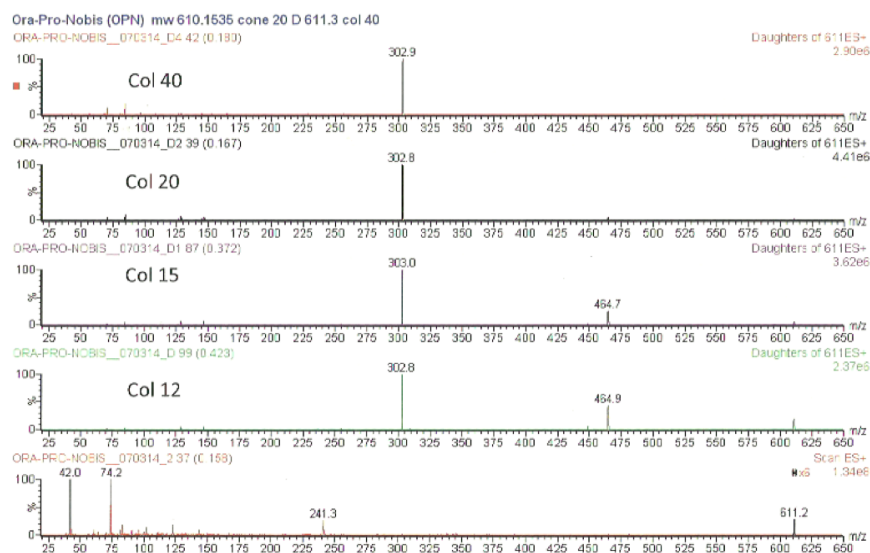


Figura 4. Cromatograma obtido por UPLC-MS do extrato metanólico do composto isolado da planta *Pereskia aculeata* variedade com ápice sem coloração

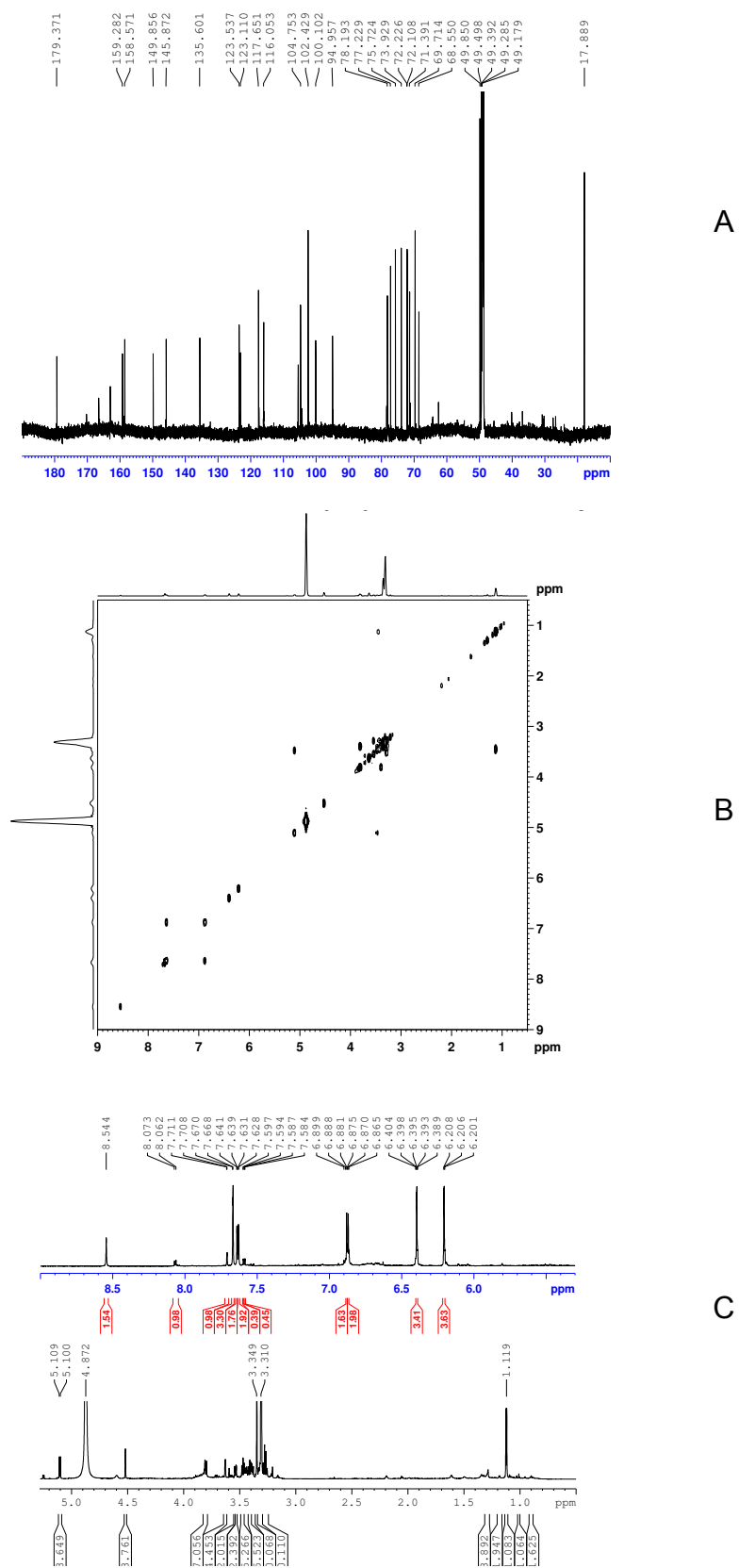


Figura 5. Espectros obtidos por RMN do extrato metanólico do composto isolado da planta *Pereskia aculeata* variedade com ápice sem coloração.

(A) ^{13}C , (B) Cosy e (C) ^1H

Apêndice B

Quantificação de ácidos biliares em ratos tratados com a planta

Pereskia aculeata

Após a coleta dos órgãos (fígado, intestino delgado e grosso) e fluidos (sangue, urina e fezes) dos animais tratados com *P. aculeata* realizou-se a extração e posterior quantificação dos ácidos biliares por UPLC MS/MS. Os resultados preliminares foram reunidos nas tabelas a seguir apresentadas.

Tabela 1. Concentração total de ácidos biliares nas fezes de ratos tratados com *Pereskia aculeata* (µg/g)

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Dia -1*	115,14	107,90	149,37	79,20
Dia 0	141,93	124,16	109,09	85,86
Dia 1	95,94	92,73	90,84	86,24
Dia 2	126,71	129,79	154,27	131,5
Dia 3	122,73	128,22	109,68	124,92
Dia 7	72,65	63,85	63,55	72,75
Dia 13	58,55	64,87	51,94	51,34

Grupo 1 – 0 mg/kg; Grupo 2 – 1250 mg/kg; Grupo 3 – 2500 mg/kg; Grupo 4 – 5000 mg/kg de peso corporal. * Referente ao dia de administração do extrato.

Tabela 2. Total de ácidos biliares na urina de ratos tratados com *Pereskia aculeata* (µg/g)

Urina	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Dia -1*	66,71	65,11	46,59	79,75
Dia 0	24,28	26,92	44,46	87,10
Dia 1	31,44	24,69	90,38	50,09
Dia 2	71,29	47,00	102,87	65,13
Dia 3	28,17	64,78	116,32	38,76
Dia 7	50,38	85,17	158,75	95,69
Dia 13	63,66	81,89	119,45	80,35

Grupo 1 – 0 mg/kg; Grupo 2 – 1250 mg/kg; Grupo 3 – 2500 mg/kg; Grupo 4 – 5000 mg/kg de peso corporal. * Referente ao dia de administração do extrato.

Tabela 3. Concentração total de ácidos biliares no fígado, sangue e intestino delgado e grosso de ratos tratados com *Pereskia aculeata* (µg/g)

	Grupo 1	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4
Fígado	33,69	35,67	46,22	35,99
Sangue	5,61	3,58	6,64	2,43
Intestino delgado	101,32	88,05	61,89	100,7
Intestino grosso	38,05	32,29	41,01	61,91

Grupo 1 – 0 mg/kg; Grupo 2 – 1250 mg/kg; Grupo 3 – 2500 mg/kg; Grupo 4 – 5000 mg/kg de peso corporal.