



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS  
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE PALMA  
FORRAGEIRA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM  
MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL**

**Patrícia Marques de Farias**

**Fortaleza**

**2016**

**PATRÍCIA MARQUES DE FARIAS**

**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE PALMA  
FORRAGEIRA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM  
MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de alimentos.

Orientador: Profa. Dra. Lucicléia Barros de Vasconcelos Torres

Coorientador: Dra. Janice Ribeiro Lima

Fortaleza

2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- F238e Farias, Patricia Marques de.  
Extração e caracterização do extrato de palma forrageira e avaliação do potencial antioxidante em modelo de lesão gástrica induzida por etanol / Patricia Marques de Farias. – 2016.  
74 f. : il. color.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Fortaleza, 2016.  
Orientação: Profa. Dra. Lucicléia Barros de Vasconcelos Torres.  
Coorientação: Profa. Dra. Janice Ribeiro Lima.
1. Opuntia fícus-indica. 2. Compostos fenólicos. 3. Atividade antioxidante. 4. lesão gástrica alcoólica induzida. I. Título.

CDD 664

---

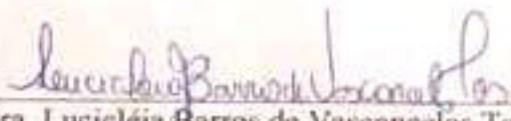
PATRÍCIA MARQUES DE FARIAS

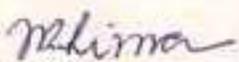
**OBTENÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DO EXTRATO DE PALMA  
FORRAGEIRA E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL ANTIOXIDANTE EM  
MODELO DE LESÃO GÁSTRICA INDUZIDA POR ETANOL.**

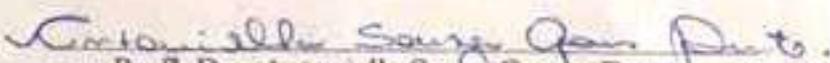
Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de alimentos.

Projeto de dissertação aprovado em: 10 /03 /2016

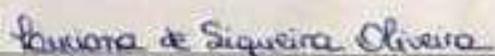
Banca Examinadora

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Lucicléia Barros de Vasconcelos Torres (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
Dra. Janice Ribeiro Lima (Coorientadora)  
Embrapa Agroindústria Tropical

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

  
Dr. Guilherme Julião Zocelo  
Embrapa Agroindústria Tropical

  
Prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana de Siqueira Oliveira  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

A Deus.

A minha família.

Aos professores e doutores envolvidos.

## AGRADECIMENTO

A Deus, por sua presença em minha vida e por alimentar meu espírito de esperança e compaixão.

À CAPES, pelo apoio financeiro com a bolsa de mestrado.

À Universidade Federal do Ceará.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. À Profa. Dra. Lucicleia Barros de Vasconcelos Torres, pela orientação, por acreditar no projeto, pelas palavras de carinho e incentivo pelas conversas que contribuíram para o meu crescimento profissional.

À EMBRAPA, pela disponibilidade de espaço e equipamentos.

À Dra. Janice Ribeiro Lima e ao Dr. Guilherme Julião Zocolo, da Embrapa Agroindústria Tropical, por sua disponibilidade, pelo acolhimento em seus laboratórios, pelo aprendizado e pelos ensinamentos experimentais para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Antoniella Souza Gomes Duarte, pela contribuição de conhecimento, pelo espaço cedido no seu laboratório e pelo aprendizado.

Aos participantes da Banca Examinadora, pela enorme contribuição com suas valiosas sugestões no desenvolvimento e escrita deste trabalho.

À Profa. Dra. Maria Socorro de Souza Carneiro e ao Departamento de Zootecnia da UFC, por terem cedido a matéria-prima deste trabalho durante a realização do experimento.

Aos professores do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pelo conhecimento passado durante a realização das disciplinas e em especial a Profa. Dra. Luciana de Siqueira Oliveira, por acreditar no meu projeto e pela enorme contribuição no desenvolvimento deste e à coordenadora do curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da UFC Profa. Dra. Dorasilvia Ferreira Pontes, pelo direcionamento no início do mestrado.

Aos colegas e funcionários da Embrapa Agroindústria Tropical Cláudia Oliveira, Paulo Riceli e Lorena Mara, pela paciência e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Aos funcionários do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Paulo Mendes, Pereira, Seu Luís e Luciano pela ajuda e boa vontade.

Aos colegas dos vários laboratório da UFC e da Embrapa pelos quais passei durante o desenvolvimento deste projeto, Kessia, Larissa, Andreza, Karine, Natália, Luciana Carneiro, Mayla e Dainesy, pela ajuda e companheirismo.

Ao agrônomo João Brandão, pela ideia inicial deste trabalho.

À minha família, em especial às minhas irmãs Gleiciane e Brenda, pelo incentivo e pelo carinho e a minha avó linda Maria Marques Nonato pelo amor dedicado a mim e pelo apoio financeiro.

Ao meu namorado Yuri, pela cumplicidade e incentivo em todos os momentos; por sua presença e apoio incondicional e a sua família pelo acolhimento e carinho.

## RESUMO

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) é originária do México, porém é bem adaptada às condições do semiárido Nordeste. Seus caules jovens, denominados cladódios, são consumidos normalmente na dieta alimentar dos mexicanos, sendo também utilizada na medicina popular. Diante de tais informações, este estudo teve como objetivo a obtenção e caracterização do extrato liofilizado de palma forrageira e a avaliação do seu potencial antioxidante *in vivo*. Foram realizados: testes de rendimento, análise de citotoxicidade *in vitro* (teste do MTT); caracterização química e bioquímica em relação ao metabolismo antioxidante: espectroscopia de ressonância magnética nuclear (RMN) e cromatografia líquida de ultra performance (UPLC-QTOF); atividade antioxidante total (AAT); análise de enzimas antioxidantes: catalase (CAT) e dismutase do superóxido (SOD) e análise *in vivo*, através do modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol 50% e da determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) e glutathiona (GSH). O extrato encapsulado com maltodextrina foi submetido a análises físicas de umidade, higroscopicidade, grau de *caking*, e microscopia eletrônica de varredura (MEV). De acordo com os resultados alcançados, foi possível obter um rendimento de 2,30%. O teste do MTT demonstrou que o extrato não possui efeito tóxico as células (cultura IEC-6). Foram detectados, através do UPLC-QTOF, a presença de polifenóis como os flavonóides quercetina, rutina e isorhamnentina. A RMN identificou aminoácidos como a tirosina e ácidos orgânicos, como o ácido gama-aminobutírico. Foi determinado uma atividade enzimática de 19,92 UAE. mg<sup>-1</sup> de proteína de SOD, 1,18 μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> . mg<sup>-1</sup> de proteína. min<sup>-1</sup> de CAT e 59,73 μM Trolox. g<sup>-1</sup> MS de AAT. A encapsulação do material foi confirmada através da MEV, sendo escolhida a proporção 2:1 maltodextrina:palma, respectivamente, com valores 5,74% de umidade, 1,48% de higroscopicidade e 48,34% de grau de *caking*. O pré-tratamento com extrato de palma, nas três doses testadas (1, 3 e 10 mg/kg), foi capaz de reduzir de forma significativa a formação de lesões gástricas e os níveis de MDA, sendo a dose de 3 mg/kg capaz de preservar os níveis de GSH. Os dados obtidos na caracterização química e bioquímica estão diretamente relacionados à atividade antioxidante do extrato de palma no modelo experimental de estresse oxidativo induzido por etanol 50%.

**Palavras-chaves:** *Opuntia ficus-indica*; compostos fenólicos; atividade antioxidante; lesão gástrica alcoólica induzida.

## ABSTRACT

The cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) is originally from Mexico, but is well suited to semi-arid conditions of the Brazilian Northeast. Their young stems called cladodes are normally consumed in the diet of Mexicans, and is also used in traditional medicine because of its beneficial properties popularly recognized (anti-ulcer, anti-inflammatory, etc.). Faced with these evidences, to the freeze-dried extract of cactus pear obtained in this study were performed: yield tests, in vitro cytotoxicity assay (MTT test); Chemical characterization by nuclear magnetic resonance spectroscopy (NMR) and ultra performance liquid chromatography (UPLC-QTOF); total antioxidant capacity (TAC); analysis of antioxidant enzymes: catalase (CAT) and superoxide dismutase (SOD) and in vivo analysis using the experimental model of gastric injury induced by alcohol 50% in rats Wistar. The extract encapsulated with maltodextrin was subjected to physical analysis of moisture, hygroscopicity, degree of caking and scanning electron microscopy (SEM). According to the results achieved, it was possible to obtain a yield of 2.30%. The MTT test showed that extract has no toxic effect cells (IEC-6 culture). They were detected by UPLC-QTOF, the presence of polyphenols such as flavonoids quercetin, rutin and isorhamnentina. NMR identified amino acids such as valine, threonine and organic acids such as gamma-aminobutyric acid. They were identified in the material 19.92 UAE.  $\text{mg}^{-1}$  of protein of SOD,  $1,18 \mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot \text{mg}^{-1}$  of protein .  $\text{min}^{-1}$  of CAT and  $59,73 \mu\text{M Trolox} \cdot \text{g}^{-1}$  DM de TAC. The encapsulation material was confirmed by SEM and was chosen proportion (2:1) maltodextrin: palm, respectively, with values 5.74% moisture, 1.48% hygroscopic and 48.34% of degree of caking. It has been observed in vivo, that pretreatment with palm extract, the three tested doses (1, 3 and 10 mg / kg), was able to significantly reduce the formation of gastric lesions and MDA levels. The results show that palm extract has antioxidant activity in an experimental model of oxidative stress with 50% alcohol.

**Keywords:** *Opuntia ficus-indica*; phenolic compounds; antioxidant activity; alcohol-induced gastric damage.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Cladódio de Palma forrageira ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ).....	18
Figura 2. Fluxograma de obtenção do extrato de Palma forrageira. ....	28
Figura 3. Cladódio de palma cortado em cubos de aproximadamente de 2 cm <sup>2</sup> em repouso em água destilada. ....	29
Figura 4. Extrato líquido da palma forrageira. ....	29
Figura 5. Extrato liofilizado de palma forrageira. ....	30
Figura 6. Fluxograma de obtenção do extrato de palma forrageira adicionado de maltodextrina. ....	36
Figura 8. Inserção dos “stubs” no porta-amostra. ....	38
Figura 7. Computadores usados na operação do microscópio Inspect F50.....	38
Figura 9. Fluxograma da indução da lesão gástrica com etanol 50% em ratos Wistar. ....	39
Figura 10. Espectro 1H RMN dos principais metabólitos no extrato de palma. 1 – Tirosina; 2 – Ácido málico; 3a – $\alpha$ – Glucose; 3b – $\beta$ - Glucose.....	52
Figura 11. Microscopia Eletrônica de Varredura do extrato de palma liofilizado adicionado de maltodextrina: na proporção (2 malto:1 palma) (A), na proporção (3 malto:1 palma) (B) e (3 malto:1 palma) (C). ....	57
Figura 12. Avaliação do efeito protetor do extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e da maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%. A área total das lesões gástricas macroscópicas foi determinada 1 hora após administração do etanol.....	61
Figura 13. Avaliação macroscópica da mucosa gástrica de ratos pré-tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e da maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%. ....	62
Figura 14. Fotomicroscopia da mucosa gástrica de ratos pré-tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e da maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%. ....	63
Figura 15. Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de ratos previamente tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e com maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida. ....	65
Figura 16. Determinação dos níveis dos grupos sulfidrílicos não proteicos (glutathiona – GSH) na mucosa gástrica de ratos previamente tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e com maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%. ....	66

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimentos (%) e comparação das extrações do extrato liofilizado de palma, considerando as proporções 2:1 e 1:1 (palma: água), sistema em repouso a temperatura ambiente. ....	44
Tabela 2. Rendimentos (%) das extrações do extrato liofilizado de palma, proporção 1:1 de palma e água, sistema em agitação, a temperatura ambiente. ....	44
Tabela 3. Comparação entre os rendimentos obtidos, considerando a agitação e o repouso do sistema, a temperatura ambiente. ....	44
Tabela 4. Viabilidade celular (cultura IEC-6) expressa em densidade ótica (DO), a partir do ensaio MTT. ....	46
Tabela 6. Aminoácidos identificados pelo UPLC-ESI-TOFMS/MS (QTOF) em modo positivo no extrato de palma liofilizado. ....	49
Tabela 7. Substâncias identificadas pelo UPLC-ESI-TOFMS/MS (QTOF) em modo positivo. ....	50
Tabela 8. Substâncias identificadas pelo UPLC-ESI-TOFMS/MS (QTOF) em modo negativo. ....	51
Tabela 9. Sumario da composição nutricional identificada no extrato de <i>O. ficus-indica</i> . ....	53
Tabela 10. Resultados obtidos para a análise de proteínas, análises enzimáticas e análises enzimáticas e análise da atividade antioxidante total (AAT). ....	56
Tabela 11. Resultado da análise de umidade, higroscopicidade e grau de <i>caking</i> para o extrato encapsulado. ....	58
Tabela 12. Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de ratos pré-tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%. ....	64

## SUMÁRIO

1. Introdução Geral .....	14
2. Revisão Bibliográfica.....	15
2.1 Ingredientes funcionais e nutracêuticos.....	15
2.2 Palma forrageira ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ) .....	17
2.3 Extrato líquido de Palma forrageira.....	19
2.4 Liofilização .....	21
2.5. Sistema gastrointestinal .....	24
2.6. Lesão por etanol e mecanismos de proteção gástrica.....	25
3. Objetivos.....	27
3.1. Objetivo Geral .....	27
3.2. Objetivos Específicos.....	27
4. Material e Métodos.....	27
4.1. Obtenção da matéria-prima .....	27
4.2. Obtenção do extrato de palma forrageira ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ) em pó e teste de rendimento em massa.....	28
4.3. Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT <i>in vitro</i> . .....	31
4.3.1. Ensaio de MTT .....	31
4.3.1.1. Soluções .....	31
4.4. Identificação de metabólitos primários a partir de Ressonância Magnética Nuclear (RMN) .....	31
4.5. Identificação de metabólitos primários e secundários a partir do UPLC-ESI-QTOF-MS/MS (QTOF) .....	32
4.6. Enzimas antioxidantes e Atividade Antioxidante Total.....	32
4.6.1. Obtenção do extrato enzimático .....	32
4.6.2. Proteínas solúveis totais .....	33
4.6.3. Atividade da dismutase do superóxido .....	33
4.6.4. Atividade da Catalase .....	33
4.6.5. Atividade Antioxidante Total.....	34
4.7. Análises do extrato de palma encapsulado com maltodextrina .....	35
4.7.1 Fluxograma de obtenção.....	35
Fonte: próprio autor.....	36
4.7.2 Umidade.....	36
4.7.3. Higroscopicidade .....	36
4.7.4. Grau de <i>Caking</i> .....	37
4.7.5. Estudo da morfologia do extrato encapsulado através da Microscopia eletrônica de varredura (MEV).....	37
Fonte: Central Analítica – UFC. ....	38
5. Análises <i>in vivo</i> .....	39
5.1. Animais .....	39
5.2 Grupos de animais.....	40
5.2. Efeito do extrato de palma ( <i>Opuntia ficus-indica</i> ) no modelo de lesão gástrica por etanol em ratos .....	41

<b>5.3. Análise histopatológica da mucosa gástrica de ratos tratados com extrato de palma (<i>Opuntia ficus-indica</i>) encapsulado no modelo de lesão gástrica por etanol em ratos .....</b>	<b>41</b>
<b>5.5. Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de ratos tratados com extrato de palma (<i>Opuntia ficus-indica</i>) encapsulado no modelo de lesão gástrica por etanol em ratos.....</b>	<b>42</b>
<b>5.6. Análise estatística.....</b>	<b>43</b>
<b>6. Resultados e discussão.....</b>	<b>43</b>
<b>6.1 Análises do extrato liofilizado de cladódio de palma forrageira .....</b>	<b>43</b>
<b>6.1.2 Teste de Rendimento em massa.....</b>	<b>43</b>
<b>6.1.3 Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT <i>in vitro</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>6.1.4 Análise por UPLC-ESI-TOF-MS/MS (QTOF).....</b>	<b>46</b>
<b>6.1.5 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).....</b>	<b>52</b>
<b>6.2 Análises do extrato liofilizado adicionado de maltodextrina.....</b>	<b>56</b>
<b>6.2.1. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) .....</b>	<b>56</b>
<b>6.2.2 Umidade, Higroscopicidade e Grau de Caking .....</b>	<b>58</b>
<b>7. Resultados das análises <i>in vivo</i>. .....</b>	<b>59</b>
<b>7.1. Lesão gástrica.....</b>	<b>59</b>
<b>8. Conclusão .....</b>	<b>67</b>

## 1. Introdução Geral

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) é um cacto bem adaptado ao semiárido nordestino, que possui condições climáticas de poucas chuvas e solos rasos, pedregosos ou arenosos, com pouca matéria orgânica, porém ricos em minerais solúveis e pH próximo de sete (OLIVEIRA *et al.*, 2011a). O cultivo da palma e outras espécies perenes, adaptadas às condições do semiárido é uma importante alternativa para a sustentabilidade de produção nessas regiões, permitindo a fixação do homem no campo e garantindo sua qualidade de vida (DUBEUX JR *et al.*, 2012).

A palma é rica em carboidratos complexos (fibras solúveis, mucilagens, celulose, etc.), compostos fenólicos, carotenóides, vitaminas C e E, glutatona e ácidos graxos poliinsaturados. Estes e outros constituintes fazem com que esta planta apresente várias atividades terapêuticas já cientificamente comprovadas. O seu papel nas atividades antioxidante, hipolipidêmica, cicatrizante, diurética, gastroprotetora, hepatoprotetora, bem como, na hiperglicemia, na aterosclerose, no *diabetes mellitus*, entre outras, mostram que esta planta é potencialmente interessante, quando usada na prevenção e cura de várias doenças. Além de todas as atividades relatadas, acrescenta-se que a palma é muito rica nutricionalmente, o que justifica seu uso na alimentação (MARTINS, 2011).

A partir de dados epidemiológicos, ensaios clínicos e conhecimentos modernos da bioquímica nutricional, chegou-se ao estabelecimento de uma conexão entre dieta e saúde, em que certos nutrientes e não nutrientes, como as fibras, apresentam capacidade de interferir em diversos fatores de risco causadores de doenças. São substâncias chamadas nutracêuticas ou funcionais. A diferença básica entre estes alimentos está ligada aos objetivos específicos de cada um: os nutracêuticos levam em conta a prevenção e o tratamento de doenças (apelo médico), enquanto os funcionais visam à redução do risco da doença (GERMANO, P. e GERMANO, M., 2011).

No Brasil, o tratamento de úlceras pépticas é bastante caro, não sendo acessível a grande parte da população (LIMA *et al.*, 2006). O tratamento das úlceras, dessa forma, constitui ainda um grande desafio e torna-se necessário o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais eficazes, menos tóxicos e de custo mais baixo (DONATINI *et al.*, 2009). Em outra área de estudo, atuando como alternativa ou complemento a ação dos fármacos estão os alimentos, cujos benefícios vão além da saciedade da fome e das

necessidades nutricionais, podendo ser utilizados na redução dos riscos dos mais variados tipos de doenças. Utilizar matérias-primas abundantes na região Nordeste, para a criação de novos produtos possíveis de serem usados no tratamento e prevenção de problemas gástricos torna-se uma solução viável.

No Brasil a palma forrageira é muito utilizada para alimentação animal e pouco se tem conhecimento sobre seus benefícios na dieta humana. Um estudo mais aprofundado dessa planta pode induzir ao seu maior aproveitamento e conseqüentemente gerar renda às famílias do semiárido brasileiro, com a criação de novos produtos.

Nesse contexto o presente estudo tem como objetivo pesquisar atributos na palma forrageira que agreguem valor a mesma. Obter e caracterizar química e estruturalmente o extrato, e avaliar sua atividade antioxidante no modelo de lesão gástrica em ratos, induzida por etanol 50%.

## **2. Revisão Bibliográfica**

### **2.1 Ingredientes funcionais e nutracêuticos, definições.**

Hipócrates (460-370 a.C.) afirmou: "Deixe o alimento ser sua medicina e a medicina ser seu alimento". A relação entre alimentos e medicamentos está cada vez mais estreita. Assim, o termo nutracêutico foi primeiramente mencionado há 20 anos para descrever uma união entre nutrição e farmacêutica, ambos os fatores chave para o bem-estar humano (HALLER, 2010).

A Fundação para a Inovação em Medicina (Nova York, EUA) criou a palavra "nutracêutico" (definida como qualquer substância que possa ser considerada um alimento ou parte de um alimento que proporcione benefícios a saúde, incluindo a prevenção e tratamento de doenças), para descrever a crescente área de pesquisa biomédica centrada em torno do isolamento de nutrientes/compostos a partir de produtos naturais (de frutas, suplementos alimentares e dietas até os produtos benéficamente projetados) ou produtos à base de plantas e produtos processados (tais como cereais, sopas e bebidas) (ARUOMA, 2010).

Um alimento pode ser considerado funcional quando o mesmo tem a capacidade de afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo, além de sua função básica

de nutrir, de maneira que seja tanto relevante para o bem-estar e a saúde quanto para a redução do risco de uma doença (ROBERFROID, 2002).

Os alimentos e ingredientes funcionais podem ser classificados de dois modos: quanto à fonte, de origem vegetal ou animal, ou quanto aos benefícios que oferecem, atuando em seis áreas do organismo: no sistema gastrointestinal, no sistema cardiovascular, no metabolismo de substratos, no crescimento, no desenvolvimento e diferenciação celular, no comportamento das funções fisiológicas e como antioxidantes (SOUZA *et al.*, 2003).

O termo nutracêutico refere-se à substância bioativa, isolada ou adicionada aos alimentos como ingrediente funcional, ou sob a forma medicamentosa, contribuindo para o aumento do valor agregado (GERMANO, P. e GERMANO, M., 2011). Os nutracêuticos podem ser classificados como fibras dietéticas, ácidos graxos poliinsaturados, proteínas, peptídeos, aminoácidos, minerais, vitaminas e antioxidantes.

No Brasil, o Ministério da Saúde, através da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), regulamenta os Alimentos Funcionais através das resoluções: ANVISA/MS 18/99; ANVISA/MS 19/99, cujas definições básicas são:

a) Resolução da ANVISA/MS 18/99 - Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos (BRASIL, 1999a).

b) Resolução da ANVISA/MS 19/99 - Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem (BRASIL, 1999b).

Com isso, a alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano e a alegação de propriedade de saúde é aquela que afirma, sugere ou implica a existência de uma relação entre o alimento ou ingrediente com uma doença ou condição relacionada à saúde. Logo, o alimento ou ingrediente que alegar propriedades funcionais ou de saúde pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (BRASIL, 1999a).

Complementarmente, a Resolução RDC n. 259/02 da ANVISA define alimento como “toda substância que se ingere no estado natural, semielaborada ou elaborada, destinada ao consumo humano, incluídas as bebidas e qualquer outra substância utilizada em sua elaboração, preparo ou tratamento, excluídos os cosméticos, o tabaco e as substâncias utilizadas unicamente como medicamentos” (GERMANO, P. e GERMANO, M., 2011).

No Brasil, para definir nutracêutico, pode-se utilizar a definição de substâncias bioativas, conforme a Resolução n. 2/02, que define como nutriente ou não nutriente, presente em fontes alimentares, que possui ação metabólica ou fisiológica específica no organismo. Pode ser de origem natural ou sintética, desde que comprovada sua segurança para o consumo humano. Portanto, nutracêuticos são produtos que possuem uma forma concentrada de um ingrediente bioativo. Contudo, não se trata de um alimento, mas de um ingrediente apresentado sob forma não alimentar, para ser utilizado em doses superiores às encontradas nos alimentos usuais (GERMANO, P. e GERMANO, M., 2011).

## **2.2 Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*)**

Originária do México a palma forrageira é uma cultura bem adaptada às condições adversas do semiárido. A espécie apresenta-se como uma alternativa primordial para estas regiões, visto que é uma cultura que apresenta aspecto fisiológico especial quanto à absorção, aproveitamento e perda de água, sendo bem adaptada às condições adversas do cenário em questão (NUNES, 2011).

Famosa como uma alternativa para a alimentação dos animais durante o período de estiagem, a palma também é consumida por parte da população do semiárido nordestino. Além de ser uma importante aliada nos tratamentos de saúde, a palma é rica em vitaminas A e C, complexo B e minerais como Cálcio, Magnésio, Sódio e Potássio além de 17 tipos de aminoácidos (NUNES, 2011).

**Figura 1.** Cladódio de Palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*).



Fonte: próprio autor

Podem ser introduzidos na alimentação humana os brotos da palma ou raquetes jovens, denominados de verduras e o fruto da palma *in natura* ou processado (REINOLDS e ARIAS, 2004). Na América Latina os cladódios ou raquetes da palma e os frutos são frequentemente consumidos frescos ou processados, sendo que somente os frutos frescos são mais difundidos no mercado Europeu e Norte-Americano (FEUGANG *et al.*, 2006)

A palma é uma planta cujos caules jovens, denominados cladódios, e seus frutos são consumidos normalmente na dieta alimentar dos mexicanos. A mesma também é utilizada na medicina tradicional, desde há muitos anos, devido às suas propriedades benéficas popularmente reconhecidas (antiulcerogênica, antiinflamatória, cicatrizante, hipoglicemiante, hipolipidêmica, no tratamento de afecções respiratórias, entre outras). Estas propriedades têm suscitado o interesse de vários investigadores (MARTINS, 2011).

Os principais constituintes dos cladódios da palma são carboidratos complexos (ex: fibras solúveis, celulose, mucilagem) (TROMBETTA *et al.* 2006). É relatado no trabalho desenvolvido por Galati *et al.* (2001) e (2002) que extratos de cladódios da palma têm o poder de proteção da mucosa gástrica, através do qual podem prevenir as úlceras gástricas. Estudos realizados por Garcia *et al.* (2004) apontam que o cacto tem

uma capacidade de tamponamento que está relacionado com os estudos acima. Ramírez *et al.*, (2006) salientam que a mucilagem do cacto acelera a restauração da mucosa gástrica com gastrite alcoólica induzida em ratos.

### 2.3 Extrato líquido de Palma forrageira

A família Cactaceae é caracterizada pela sua produção de mucilagem. A mucilagem é um hidrato de carbono complexo, parte da fibra dietética. Por esta e outras razões é um componente com excelentes perspectivas como um aditivo não só para a indústria alimentar, mas também para outras utilizações industriais (SÁENZ; SEPÚLVEDA e MATSUHIRO, 2004).

Os cladódios são caules modificados e substituem as folhas na sua função fotossintética. São órgãos suculentos e articulados com formato alongado ou ovóide (30-80 cm de comprimento e 18-25 cm de largura). A parte interior dos cladódios é formado por clorênquima, onde a fotossíntese é realizada, e a parte central é formada por um parênquima medular branco cuja função principal é o de armazenamento de água. Existem células mucilaginosas em ambos, que armazenam mucilagem (SUDZUKI, 1995 *apud* SÁENZ; SEPÚLVEDA e MATSUHIRO, 2004).

Polissacarídeos solúveis em água, polímeros de cadeia longa com um peso molecular elevado, estão geralmente presentes em paredes celulares de plantas, com uma variedade de estruturas. As composições de acordo com a estrutura do polissacarídeo são bastante diferentes devido a diferentes métodos de cultivo e regiões, embora os polissacarídeos sejam obtidos a partir da mesma espécie (GONZAGA *et al.*, 2005).

Um extrato hidroalcoólico da casca do fruto da *O. ficus-indica*, conhecido como figo da Índia, utilizado como substituto da vitamina E e antioxidante em margarina, apresentou-se rico em compostos fenólicos totais (1512,58mg GAE/ 100g DM). Com a ajuda de um HPLC foi possível identificar a presença de 16 compostos entre ácidos hidroxibenzóicos, ácidos hidroxicinâmicos e flavonoides (CHOUGUI *et al.*, 2015).

Zhong, *et al.* (2010) afirmam que o pó obtido de *O. ficus-indica*, originária da China, é amarelo e solúvel na maioria dos reagentes inorgânicos (ácidos, bases e sais). As reações cromogênicas com fenol – H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(c) e antrona - H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>(c) foram evidentes o

que, segundo os autores, indica que a composição principal do pó era de polissacarídeos. Segundo o mesmo, a partir de análises em HPLC, a constituição do polissacarídeo da *O. ficus-indica* é basicamente de glicose. Após a hidrólise com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> também pelo sistema HPLC foram detectadas ramnose, arabinose e glicose.

Como complemento desta pesquisa, uma caracterização realizada por Díaz *et al.* (2010), obteve rendimento da mucilagem de palma de 0,68% (base úmida) e a análise por HPLC indicou a presença de galactose, arabinose, xilose, ácido galacturônico, e glicose. Apresentando ainda em sua composição química em base seca: proteínas, cálcio e lipídeos.

Em um estudo realizado por Zourgui *et al.* (2008), foi possível constatar que o pré-tratamento, 24 horas antes, com a menor dose do extrato de *O. ficus-indica* administrada em camundongos (25 mg/kg) foi capaz de prevenir os efeitos nocivos da zearalenona, uma micotoxina amplamente distribuída e encontrada em alta incidência em muitos alimentos. Esta micotoxina já foi associada a vários distúrbios reprodutivos em diferentes animais, além de ser considerada hepatotóxica e hematotóxica. De acordo com o autor o extrato dos cladódios do cacto impediu até 100% da peroxidação lipídica induzida pelo tratamento com zearalenona em camundongos.

Ratos tratados com extrato de raiz de *O. ficus-indica* apresentaram uma atenuação dose-dependente das alterações histopatológicas induzidas por etanol. Dessa forma, evidenciando que o extrato metanólico de raiz de *Opuntia ficus-indica f. inermis* (ORE), teve um efeito antioxidante e um efeito gastro-protetor sobre as lesões gástricas induzidas pelo etanol. Devido à riqueza do extrato em flavonóides e compostos fenólicos, atividade antioxidante *in vitro* moderada, e sua atividade antiulcerosa potente *in vivo* sugere-se que o extrato pode ter uma atividade antioxidante semelhante a atividade antiulcerogênica da ranitidina, medicamento antiúlcero (ALIMI *et al.*, 2010).

De acordo com Ramírez *et al.*, (2006) a administração do extrato de cladódios de palma (*Opuntia ficus-indica*) em ratos (5mg/kg de peso corporal por dia) no tratamento de úlcera gástrica induzida por etanol 50%, após 72 horas foi capaz de corrigir as alterações encontradas na membrana plasmática, especialmente na sua composição lipídica, sugerindo que a mucilagem pode acelerar a reparação de lesões da mucosa gástrica de ratos submetidos a gastrite. O exame histológico revelou que a ação

principal da mucilagem na mucosa gástrica ferida era um efeito anti-inflamatório, que parecia estar envolvido na restituição da integridade da mucosa. Galati, *et al.*, (2002) relataram que a mucilagem da palma contém ácido poligalacturônico e arabinogalactano, que podem interagir com macromoléculas ou pequenos ligantes da mucosa gástrica, aumentando a produção de muco gástrico, fato analisado através da avaliação histológica da quantidade de muco por microscopia.

A administração do extrato também normalizou atividade da LDH (lactato desidrogenase), porém somente após 3 doses (24h, 48h e 72h), sugerindo que a administração do extrato do cladódio de *O. ficus indica*, para animais com gastrite induzida por etanol, poderia não apenas corrigir as alterações no plasma membranas, mas também praticamente normalizar as atividades de algumas enzimas solúveis presentes na fração citosólica obtida a partir da mucosa gástrica (RAMÍREZ *et al.*, 2006).

## **2.4 Liofilização**

Atualmente, tem crescido o número de adeptos a hábitos de uma vida mais saudável, porém em meio ao ritmo acelerado da vida cotidiana é cada vez mais frequente a oferta de produtos prontos e/ou semi-prontos nos supermercados, incluindo temperos, sopas, sobremesas, frutas e até ovo em pó. Entretanto, associados a estes novos produtos são necessários recursos tecnológicos para que junto à praticidade, haja também uma preservação dos nutrientes, aliando segurança alimentar com a extensão da vida de prateleira.

A secagem de frutas é empregada para melhorar a estabilidade através da diminuição da atividade de água de modo a minimizar reações químicas e enzimáticas que ocorrem durante o armazenamento do material, assim como agregar valor e diminuir os desperdícios pós-colheita (MARQUES, 2008).

A liofilização é um processo de desidratação de produtos em condições de pressão e temperatura pré-definidos tais que, a água previamente congelada, passa do estado sólido para o estado gasoso por sublimação. Como esse processo é realizado a baixa temperatura e na ausência do ar atmosférico, permite-se que as propriedades químicas e sensoriais inerentes ao alimento praticamente não se alterem (MENEZES *et al.*, 2009).

O processo de liofilização é considerado o melhor método de secagem para materiais termossensíveis e para a obtenção de produtos desidratados com elevada qualidade. Consequentemente, esta técnica tem sido empregada principalmente na desidratação de materiais com elevado custo comercial como as frutas tropicais (MARQUES, 2008).

Mesmo a liofilização sendo um processo muito suave é possível que antes do processo de desidratação, durante a preparação de dispersões em água ocorra à hidrólise ou oxidação de compostos de interesse, devido à presença do oxigênio ambiente. No entanto no estudo feito por Laine, *et al.* (2008) não houve grandes mudanças em termos de conteúdo do polifenol, nem tampouco mudanças visíveis de coloração, relacionada à presença do polifenol analisado, não perdendo, assim, seu potencial antioxidante durante o armazenamento. Porém o efeito protetor em relação aos fenólicos não foi associado somente à desidratação, mas também a outros fatores relacionados à matriz de maltodextrina utilizada nas microcápsulas.

Em comparação com os produtos obtidos através de outros métodos de desidratação, frutos liofilizados têm uma estrutura mais porosa, bem como maior retenção de sabor e aroma. A Alta porosidade facilita a re-hidratação com água ou outros solventes adequados (CEBALLOS, *et al.*, 2012). Produtos liofilizados tendem a ser altamente higroscópicos, porém essa higroscopicidade pode ser reduzida pela adição de adjuvantes como a goma arábica e a maltodextrina. Esses produtos têm a capacidade de aumentar a estabilidade, agindo como uma barreira na absorção de água (COCK, MUÑOZ E APONTE, 2015).

Alimentos em pó com altas higroscopiedades promovem um fenômeno conhecido como caking, que dificulta a utilização desses produtos (CARLOS *et al.*, 2005). A higroscopicidade de um alimento está ligada à sua estabilidade física, química e microbiológica; desta forma, torna-se imprescindível o conhecimento do comportamento higroscópico desses produtos (OLIVEIRA *et al.*, 2012).

Alimentos que contenham muitos açúcares, tais como sacarose, glicose e frutose são, geralmente, muito higroscópicos. Esses açúcares são responsáveis por fortes interações com moléculas de água principalmente quando se apresentam no estado amorfo. A liofilização de sucos de frutas produz pós com altas quantidades de açúcares

amorfo sendo, portanto, responsável pela elevada higroscopicidade desses pós (CARLOS *et al.*, 2005).

Adjuvantes de secagem podem ser misturados aos sucos ou polpas de frutas com a finalidade de reduzir a higroscopicidade dos pós obtidos. A maltodextrina é um adjuvante muito utilizado na obtenção de alimentos em pó, incluindo aqueles que passam pela liofilização. Apesar da adição da maltodextrina conferir maior estabilidade ao pó, o mesmo não deve ser exposto aos ambientes com elevadas umidades relativas, sendo recomendado o uso de embalagens impermeáveis ao vapor de água (OLIVEIRA *et al.*, 2014).

A maltodextrina é um polissacarídeo com peso molecular médio de 1800 g/mol, contribui nutricionalmente com 4 calorias por grama. Pode ser obtida por hidrólise parcial, ácida e/ou enzimática do amido, batata, arroz ou milho. Foi reconhecido pela FDA como GRAS (substância geralmente reconhecido como segura). Sua composição química compreende unidades de D-glicose unidas por ligações  $\alpha$ -(1-4) e com um baixo número de ligações  $\alpha$ -(1,6). É caracterizada por ter entre 2 e 20 equivalentes de dextrose (DE). Para o processo de microencapsulação as maltodextrinas DE 10-20 foram classificadas como mais eficazes (LOPERA *et al.*, 2009).

Esse material é pouco higroscópico e por essa razão tem aplicação nos produtos onde ganhos significativos de umidade são indesejáveis. É normalmente usado em sistemas alimentícios para controlar a cristalização de sacaroses e dextroses. A presença da maltodextrina irá impedir que estes dois açúcares se aglomerem e formem uma estrutura endurecida. As maltodextrinas são especialmente adequadas para desidratação de sucos de frutas (PEDRO, 2009).

Um estudo com o objetivo de se obter uvaia desidratada pelo processo de liofilização realizado por Oliveira *et al.* (2010), apresentou uma redução no teor de umidade equivalente a 78,22%, uma vez que a fruta *in natura* apresentou umidade inicial de 92,47%, decrescendo para 14,25% após a liofilização. A determinação de umidade é uma das medidas mais importantes e utilizadas na análise de alimentos. O teor de umidade de um alimento está relacionado com sua estabilidade, qualidade e composição, e pode afetar o armazenamento, embalagens e processamento (CHAVES *et al.*, 2004).

Através da técnica de liofilização é possível obter produtos termossensíveis mais compactos e homogêneos, deixando-os mais leves e facilitando alguns processos como armazenamento e transporte, fator que proporciona uma maior área de distribuição, além de aumentar a vida de prateleira desses produtos.

## **2.5. Sistema gastrointestinal**

O trato gastrointestinal (TGI) é dividido em porção superior, delimitado a boca, esôfago e estômago, por uma porção mediana, constituindo o intestino delgado e uma porção inferior, representada por ceco, colón e reto. Compreendido de várias camadas dentre elas: mucosa, submucosa, muscular (fibras lisas e longitudinais) e serosa (PORTH, KUNERT, 2004). Apresenta como funções principais: a secreção gástrica, êmese, motilidade do intestino, expulsão de fezes, formação da bile e suprimento de água, eletrólitos e nutrientes para o organismo, sendo estas controladas por um sistema neuro-hormonal (RANG, et al., 2004).

Dentre os órgãos que compreendem o TGI, o estômago é dos que apresenta maior dilatação, possuindo uma capacidade para armazenamento de 1,5 a 2,5 litros (HAMILTON, 1982). O estômago é um órgão que exerce papel importante na digestão e absorção dos alimentos por meio da secreção de ácidos, enzimas digestivas, muco e bicarbonato que são importantes para a continuidade da digestão dos carboidratos iniciada na boca, transformando o bolo alimentar em uma massa viscosa (quimo), para o início da digestão das proteínas pela ação da pepsina e para o controle na absorção de água, nutrientes e eletrólitos (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004; KOEPPEN; STATON, 2009).

Apesar das altas concentrações de ácido clorídrico, as células estomacais não sofrem lesões e isso se deve a inúmeros fatores protetores da mucosa gástrica. Fisiologicamente, há um equilíbrio entre os fatores agressores da mucosa, ácido clorídrico e pepsina, e os fatores protetores como o muco, bicarbonato, proliferação celular, prostaglandinas, mediadores gasosos (óxido nítrico e sulfeto de hidrogênio) e um neuropeptídeo (peptídeo relacionado ao gene da calcitonina – CGRP) (WALLACE, 2008).

## 2.6. Lesão por etanol e mecanismos de proteção gástrica

De acordo com Gomes (2009), constantemente, a superfície da mucosa do estômago é exposta a estímulos lesivos como drogas, toxinas bacterianas, proteínas heterólogas e suco gástrico. Estes estímulos lesivos determinam o aparecimento de uma reação inflamatória coordenada por vários mediadores liberados por células do epitélio e da lâmina própria, tendo como consequência final o desenvolvimento de lesões na mucosa e o aparecimento de doenças como, por exemplo, gastrite e úlcera péptica.

O etanol é uma toxina entérica que afeta a estrutura e função de vários elementos do trato gastrintestinal além de causar efeitos no sistema nervoso central. No estômago, o etanol aumenta a secreção gástrica de ácido levando a um estresse oxidativo com a depleção da glutathiona reduzida (GSH) que influencia a atividade da musculatura e reduz o fluxo sanguíneo, aumentando os riscos de hemorragias e ulcerações (BODE e BODE, 2000; MACMATH TL, 1990; SANTOS e RAO, 2001 *apud* GOMES, 2009).

As doenças do trato gastrintestinal, relacionadas ao consumo excessivo de etanol ou drogas antiinflamatórias não esteroidais, possuem um importante papel na gastroenterologia clínica, sendo o foco da farmacoterapia atual a descoberta de mecanismos de defesa da mucosa para acelerar a cicatrização/cura destas patologias (CHAMBERLAIN, 1993 *apud* GOMES, 2009).

A úlcera péptica é considerada uma patologia heterogênea de etiologia multifatorial, com isto há um maior índice de incidências ocasionando representatividade na economia global (BUCCIARELLI *et al.*, 2010). A sua prevenção e cura são um dos desafios mais importantes da medicina, pois esta patologia é de ocorrência mundial (CALAM; BARON, 2001; SUNG; KUIPERS; EL-SERAG, 2009). A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 4,5% da carga global de doenças e lesões e 4% de todas as mortes do mundo são atribuídas ao consumo excessivo de etanol (OMS, 2011)

A etiologia da úlcera gástrica ainda não está totalmente elucidada. Fato conhecido é que ocorre um desequilíbrio entre os fatores agressores (secreção de ácido e pepsina) e os fatores citoprotetores da mucosa gástrica (secreção de bicarbonato, secreção de muco e produção de prostaglandinas) (BORRELLI e IZZO, 2000). Tendo os agressores endógenos e exógenos uma ação que aumenta a permeabilidade do ácido, favorecendo uma cadeia de eventos, iniciando uma lesão direta á mucosa, ocasionando uma

destruição da submucosa e, por conseguinte alterações mais intensas (TWEDT, MAGNE, 1992).

O desequilíbrio entre os fatores de proteção e agressores leva também ao acúmulo excessivo de espécies reativas de oxigênio (EROs) nas células, especialmente o ânion superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), o radical hidroxil ( $OH^{\bullet}$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) acarretando em um estresse oxidativo. (MØLLER *et al.*, 2007).

Dentre os produtos da peroxidação de ácidos graxos poliinsaturados pelos radicais livres o malondialdeído (MDA) é o principal e o mais estudado, sendo considerado um indicador de estresse oxidativo e pode ser medido em condições ulcerativas e inflamatórias do trato gastrointestinal. O MDA provoca efeitos biológicos potentes sobre as proteínas, DNA, lipoproteínas, e colagênio (RIO *et al.*, 2005).

Na defesa contra os fatores agressores e para evitar danos oxidativos, a mucosa gástrica conta com a ação de um sistema antioxidante contra os danos causados pelos radicais livres, onde a concentração das EROs deve ser mantida em níveis não tóxicos por meio de mecanismos antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos (MØLLER *et al.* 2007). Os antioxidantes endógenos enzimáticos são os responsáveis pela defesa e reparo das lesões provocadas pelas EROs no organismo, e os principais são, as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GPx) e a glutathione reduzida (GSH) que removem cataliticamente as substâncias reativas (VASCONCELOS *et al.*, 2007). Já os antioxidantes não enzimáticos compreendem a segunda linha, constituída de compostos de moléculas químicas pequenas, como vitaminas, ácido úrico, flavonoides da dieta, carotenoides e a glutathione (GSH) (CNUBBEN *et al.*, 2001).

A glutathione (GSH) é um tripeptídeo composto de glutamato, glicina e cisteína. Este composto exibe um grande número de funções essenciais para a célula, incluindo transporte de aminoácidos, catálise enzimática e proteção contra os efeitos danosos dos radicais livres endógenos e metabólitos tóxicos (MEISTER, 1991; ROSS, 1988). A atividade antioxidante do GSH é mediada por dois mecanismos: primeiro, o GSH pode diretamente remover radicais livres oriundos do estresse oxidativo promovido pela ação danosa do etanol; segundo, o GSH pode funcionar como um substrato para a glutathione peroxidase (GPx), eliminando peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos no citosol e mitocôndrias (ROSS, 1988). Algumas substâncias capazes de causar injúrias na mucosa

gástrica, como o etanol, estão associadas a uma diminuição dos níveis de GSH, enquanto os agentes conhecidos por causar proteção na mucosa gástrica, como as prostaglandinas, aumentam a concentração de GSH (MIZUI e DOTEUCHI, 1986).

### **3. Objetivos**

#### **3.1. Objetivo Geral**

Este estudo tem como objetivo geral obter o extrato dos cladódios da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) e avaliar sua atividade antioxidante no modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol 50%.

#### **3.2. Objetivos Específicos**

- Obter o extrato liofilizado dos cladódios de palma (*Opuntia ficus-indica*) e selecionar o processo de extração mais viável em função do rendimento em massa total.
- Analisar a toxicidade do extrato liofilizado *in vitro* através do ensaio de MTT.
- Caracterizar os principais constituintes do extrato, como polifenóis, aminoácidos e carboidratos, através das análises de cromatografia líquida e ressonância magnética nuclear.
- Realizar a encapsulação do extrato, utilizando como material de parede a maltodextrina, e caracterizar fisicamente as capsulas obtidas através de análises físicas e Microscopia Eletrônica de Varredura.
- Avaliar o efeito antioxidante do extrato obtido no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%, *in vivo*, em ratos Wistar através da dosagem de malondialdeído e glutatona no tecido gástrico.

### **4. Material e Métodos**

#### **4.1. Obtenção da matéria-prima**

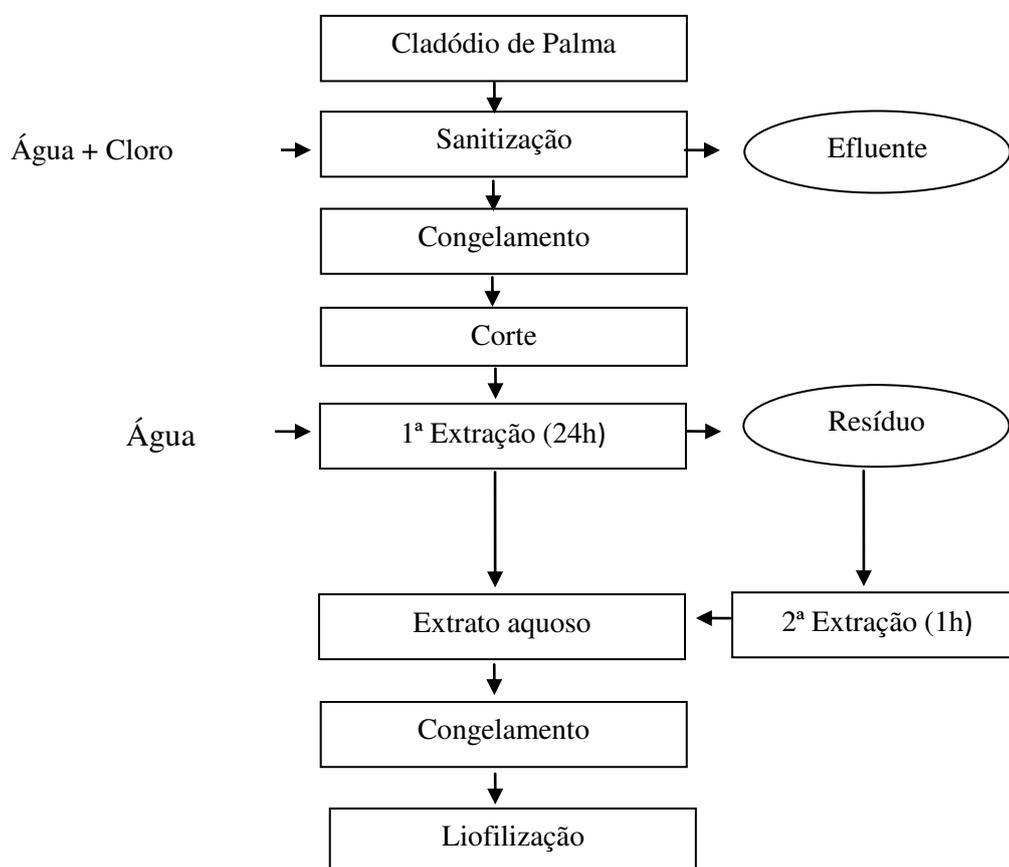
Os cladódios de palma foram selecionados de acordo com o tamanho, não ultrapassando 22 cm no sentido longitudinal, sendo colhidos durante o período da

manhã na plantação de palma forrageira pertencente ao Departamento de Zootecnia da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, Ceará.

#### 4.2. Obtenção do extrato de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) em pó e teste de rendimento em massa

Para o teste de rendimento foi avaliado primeiramente o efeito da quantidade de água 2:1 ou 1:1 (palma:água), utilizada na obtenção do extrato, Figura 2. O extrato foi obtido a partir de uma adaptação da metodologia apresentada por Ramírez *et al* (2006).

**Figura 2.** Fluxograma de obtenção do extrato de Palma forrageira.



Fonte: próprio autor.

Os cladódios de palma foram sanitizados em água clorada (200 mg/L), congelados a -18°C em câmara de congelamento, durante tempo indeterminado e

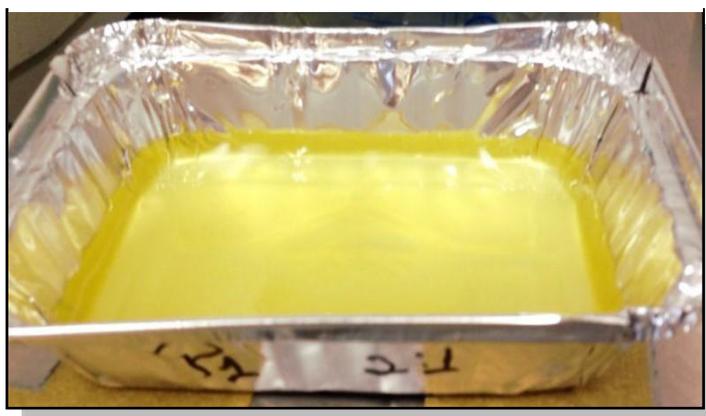
cortados em pedaços de cerca de 2 cm<sup>2</sup> (Figura 3). Para a obtenção do extrato líquido (Figura 4), os cladódios cortados e a água destilada foram pesados separadamente e posteriormente adicionados em beckers nas proporções 2:1 e 1:1 (palma:água), sendo as misturas deixadas em repouso por 24h a temperatura de ambiente. Uma segunda extração foi feita com o mesmo material, logo após a retirada do extrato líquido obtido na primeira extração, permanecendo estas amostras em contato com a água, nas mesmas proporções, por mais uma hora.

**Figura 3.** Cladódio de palma cortado em cubos de aproximadamente de 2 cm<sup>2</sup> em repouso em água destilada.



Fonte: próprio autor

**Figura 4.** Extrato líquido da palma forrageira.



Fonte: próprio autor

Após as duas etapas do processo de extração, os extratos foram misturados e em seguida congelados em Ultrafreezer Sanyo modelo MDF-U33V a  $-80^{\circ}\text{C}$  e posteriormente liofilizados (marca Liotop, modelo LP-510) em ciclo de 30 horas e temperatura final do produto de  $30^{\circ}\text{C}$ . Os extratos em pó obtidos (Figura 5) foram então pesados para o cálculo do rendimento em relação ao peso inicial de Palma utilizada. Os resultados foram avaliados por análise de variância e teste F.

**Figura 5.** Extrato liofilizado de palma forrageira.



Fonte: próprio autor

Foi também avaliado o efeito da agitação do sistema sobre o processo de extração. A extração foi realizada em duas etapas, conforme procedimento anteriormente citado, porém com os beakers sob agitação. Neste teste os cladódios cortados em pedaços de  $2\text{ cm}^2$  foram adicionados em becker na proporção 1:1 (palma:água) por 24 horas, para a primeira etapa, e posteriormente por mais 1 hora para a segunda etapa da extração. Durante o processo o material ficou sob agitação de 80 rpm a  $25^{\circ}\text{C}$  em incubadora (Tecnal modelo TE-420). O resultado foi posteriormente comparado com o obtido pelo processo de extração realizado em estado de repouso.

### **4.3. Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT *in vitro*.**

#### **4.3.1. Ensaio de MTT**

O ensaio de MTT baseia-se na redução celular de MTT [3-(4,5-dimethylthiazol, 2-yl)- 2,5-diphenyl-212 tetrazolium bromide] e foi realizado de acordo com Mosmann (1983). A quantificação da redução de MTT constitui em um método colorimétrico simples para avaliar a viabilidade celular. Após redução, formam-se cristais de formazan, de cor azul, que ao serem dissolvidos absorvem na região do visível, podendo desta forma ser quantificados por espectrofotometria. A redução do MTT é feita através de desidrogenases celulares, portanto, pode-se avaliar a capacidade redutora da célula através deste método (MOSMANN, 1983).

Neste ensaio, os sobrenadantes das culturas celulares (cultura epitelial intestinal IEC-6), contendo ou não os agentes testados, foram removidos e as células foram mantidas numa solução de MTT (5 mg.mL<sup>-1</sup>) em Meio de Krebs, durante 20 min, a 37°C, no escuro. Após esta incubação, os cristais de formazan, resultantes da redução do MTT, foram dissolvidos numa solução de dimetilsulfóxido (DMSO) e o valor de absorbância foi medido a um comprimento de onda de 570 nm.

##### **4.3.1.1. Soluções**

- Meio salino de Krebs (em mM): 132 NaCl, 4 KCl, 1,2 Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1,4 MgCl<sub>2</sub>, 6 glicose, 10 HEPES, 1 CaCl<sub>2</sub>, pH 7,4
- MTT: 0,5 mg/ml em meio salino de Krebs (proteger da luz)
- DMSO

### **4.4. Identificação de metabólitos primários a partir de Ressonância Magnética Nuclear (RMN)**

Os espectros de RMN foram obtidos em equipamento (Agilent DD2 de 600 MHz para núcleo de <sup>1</sup>H) e equipado com uma sonda (One Probe) de 5 mm de diâmetro interno (H-F/15N-31P) de detecção inversa e gradiente de campo no eixo “z”, com o objetivo principal de identificação de metabólitos primários (açúcares e aminoácidos). As amostras foram preparadas dissolvendo-se 5 mg de extrato de cladódio palma (OFI) liofilizado em 500 µL de água deuterada. Os espectros unidimensionais de <sup>1</sup>H tiveram

um tempo de espera entre cada aquisição de 5 s, ganho de 20, aquisição de 128 transientes em uma janela espectral de 22 ppm e 66k de número de pontos. Para auxiliar na atribuição dos sinais, foram realizados experimentos bidimensionais de gHSQC com 56 transientes, um tempo de espera em cada aquisição de 1 s, janela em F1 de 200 ppm e em F2 de 16 ppm, com números de pontos em F1 de 200 e F2 de 1974.

#### **4.5. Identificação de metabólitos primários e secundários a partir do UPLC-ESI-QTOF-MS/MS (QTOF)**

As análises foram realizadas num sistema Waters Acquity UPLC (Ultra Performance Liquid Chromatography), acoplado a um analisador Time-of-Flight (TOF, Waters Micromass LCT), e espectrometria de massa equipado com uma interface electrospray (ESI). A amostra passou por separações realizadas em Coluna C18 (Waters Acquity UPLC C18, 100 milímetros × 2,1 milímetros, 1.7 $\mu$ m). Tendo como objetivo principal a identificação de metabólitos secundários (compostos fenólicos), onde os perfis dos metabólitos nos extratos foram obtidos inicialmente por um gradiente exploratório, sendo as fases móveis: H<sub>2</sub>O (A) e acetonitrila (B), cada uma destas contendo ácido fórmico (0,1% v/v). As amostras foram submetidas ao seguinte gradiente exploratório: 2 – 95%. A vazão de 500  $\mu$ L min<sup>-1</sup>.

As análises de cada extrato foram realizadas em modos de ionização positivo (PI) e negativo (NI) no intervalo de 100 – 1200 Da com o tempo de aquisição de 0,1 segundo, no modo centróide. As condições ESI foram definidas da seguinte forma: tensão capilar 2800 V, tensão cone 40 V, temperatura da fonte 120 °C, temperatura dessolvatação 330 °C, fluxo de gás de cone de 20 L h<sup>-1</sup>, o fluxo de gás dessolvatação 600 L h<sup>-1</sup>, e MCP (microcanaís tensão da placa) – detector a 1900 V.

#### **4.6. Enzimas antioxidantes e Atividade Antioxidante Total.**

##### *4.6.1. Obtenção do extrato enzimático*

Como extrato enzimático foi utilizado uma alíquota de 200 mg do extrato de palma, diluídos em 10 mL de tampão fosfato de potássio 0.1M (pH 7,0), contendo ácido etilenodiamino tetra-ácetico (EDTA) 0,1 mM, e centrifugados a 3248 g por 40 minutos

a 4 °C para determinar o conteúdo de proteínas totais e a atividade das enzimas antioxidante (OLIVEIRA, 2012).

#### *4.6.2. Proteínas solúveis totais*

O conteúdo de proteínas solúveis totais foi determinado segundo Bradford (1976) utilizando como padrão albumina sérica bovina – BSA - (SIGMA). Alíquota de 0,1 mL do extrato de palma foi adicionada a 1 mL do reagente de Bradford e homogeneizado utilizando agitador de tubos tipo Vortex. Após 15 minutos de reação, as leituras das absorbâncias foram realizadas em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultrospec 2000) a 595 nm. Os resultados foram expressos em mg de proteína. g<sup>-1</sup> de extrato em pó.

#### *4.6.3. Atividade da dismutase do superóxido*

A atividade da dismutase do superóxido (SOD) (EC 1.15.1.1) foi determinada segundo Giannopolitis e Ries (1977) baseada na fotorredução do azul de nitrotetrazolio (NBT) pela luz na presença de riboflavina e metionina. Alíquota de 0,05 mL do extrato de palma em pó foi diluído em 1 mL do tampão fosfato de potássio a 50 mM, (pH 7,8) contendo EDTA 0,1 mM e metionina 19,5 mM. Na ausência de luz, foram adicionados 0,15 mL de NBT 750 mM e 0,3 mL de riboflavina 10 mM. A mistura de reação foi exposta à luz sob uma lâmpada fluorescente de 20 W por 15 minutos e a absorbância monitorada espectrofotometricamente a 560 nm. Os resultados foram expressos em UAE. mg<sup>-1</sup> de proteína, considerando que uma unidade de atividade enzimática da SOD (UAE) é definida como a quantidade da enzima requerida para promover 50% de inibição da taxa de fotorredução do NBT (BEAUCHAMP; FRIDOVICH, 1971).

#### *4.6.4. Atividade da Catalase*

A atividade da catalase (CAT) (EC 1.11.16) foi determinada conforme método descrito por Beers Júnior e Sizer (1952), com base na redução do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). Em banho-maria a 30 °C, 1,42 mL do tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,0), contendo EDTA 0,1 mM, foi aquecido durante 5 minutos. Após aquecimento foram adicionados 0,06 mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,5 M e 0,02 mL do extrato de palma

em pó, iniciando a reação. A atividade da CAT foi monitorada pelo decréscimo na absorvância a 240 nm durante 10 minutos e quantificada utilizando o coeficiente de extinção molar do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (36 M<sup>-1</sup>. cm<sup>-1</sup>). Os resultados foram expressos em μmol H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. mg<sup>-1</sup> de proteína. min<sup>-1</sup>.

#### 4.6.5. Atividade Antioxidante Total

A atividade antioxidante total (AAT) foi determinada pelo método ABTS conforme metodologia desenvolvida por Re et al. (1999) adaptada por Rufino *et al.* (2006). A técnica envolve a produção direta do radical cromóforo ABTS<sup>•+</sup> através da reação de oxidação entre a solução ABTS (2,2'-azinobis-3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) 7 mM com a solução de persulfato de potássio 140 mM mantida no escuro à temperatura ambiente por 16 horas antes de ser utilizada. A solução ABTS<sup>•+</sup> foi diluída em etanol absoluto para uma absorvância de 0,70 ± 0,02 a 734 nm.

A AAT foi avaliada com base em uma curva padrão linear utilizando como antioxidante de referência o composto 6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico (Trolox, Sigma) a 2000 μM, preparado com etanol absoluto, utilizando concentrações entre 100 e 2000 μM. Em ambiente escuro, alíquota de 0,03 mL da solução do Trolox foi adicionada a 3 mL da solução ABTS<sup>•+</sup>. As absorvâncias foram medidas em espectrofotômetro (Pharmacia, modelo Biotech Ultrospec 2000) a 734 nm, 6 minutos após a adição da solução do radical. A partir dessa curva foi obtida a equação 1, da qual calculou-se a absorvância referente a 1000 μM de Trolox.

Utilizando o extrato obtido foram preparadas três concentrações: 100.000, 50.000 e 25.000 mg/L. Seguindo os mesmos procedimentos utilizados na determinação da curva padrão do Trolox uma equação linear 2, também foi obtida. A AAT das amostras foi calculada substituindo na equação 2 a absorvância equivalente a 1000 μM de Trolox. Os resultados foram expressos em capacidade antioxidante equivalente ao Trolox (TEAC) (μM Trolox/g de amostra em pó).

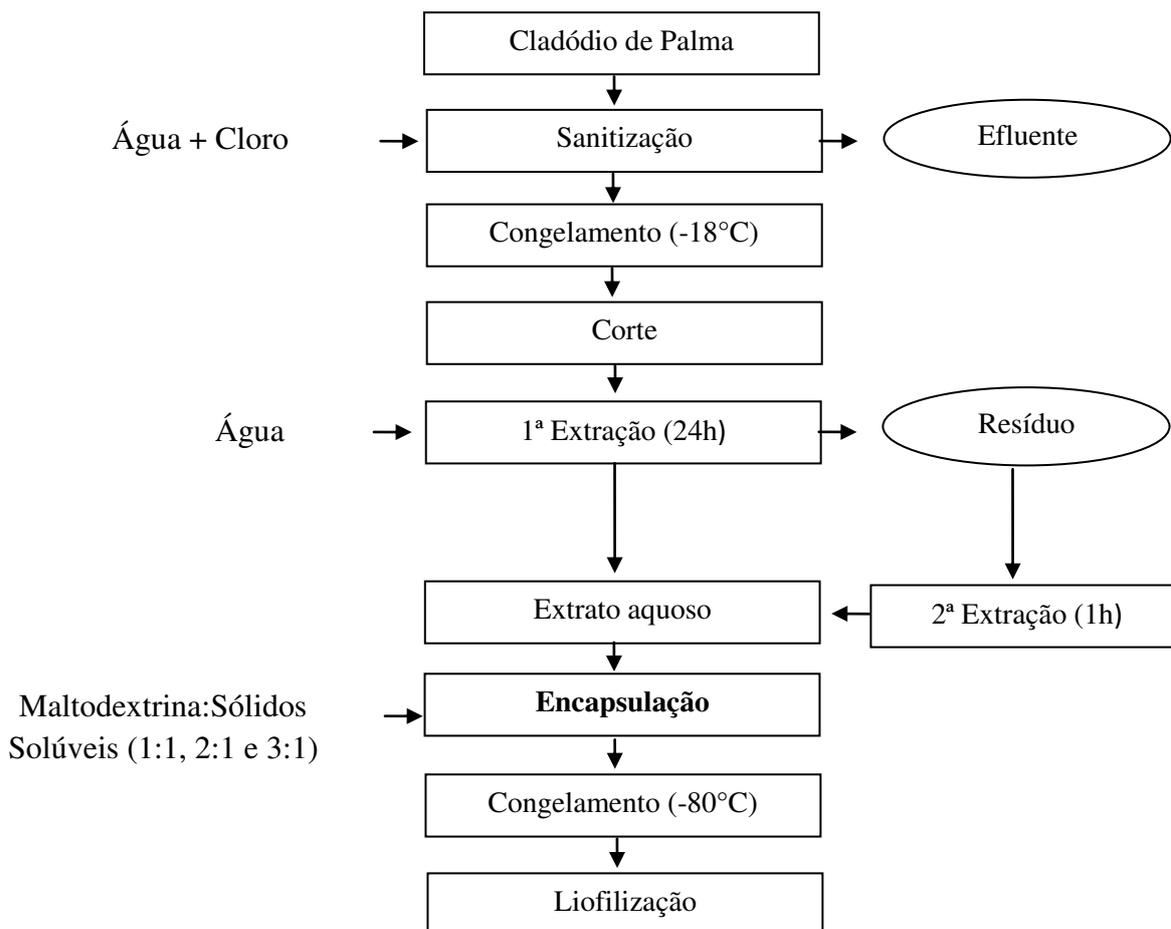
## **4.7. Análises do extrato de palma encapsulado com maltodextrina**

### **4.7.1 Fluxograma de obtenção**

Após a escolha do processo de extração com melhor rendimento (proporção palma:água 1:1), foi adicionada maltodextrina de milho (DE 20, grau alimentício - Cargil) ao extrato de palma como material de parede para formação das cápsulas.

A encapsulação com maltodextrina segue conforme fluxograma de obtenção do extrato de palma forrageira apresentado na Figura 2, com uma alteração após a obtenção do extrato líquido, onde ocorre a adição da maltodextrina. Com a ajuda de um refratômetro (ATAGO, modelo Pal-3), foram calculados os Sólidos Solúveis dos extratos líquidos, para que fosse possível calcular o percentual de maltodextrina a ser adicionado. De acordo com o teor de sólidos solúveis da amostra, a maltodextrina foi adicionada nas proporções 1:1, 2:1 e 3:1 (maltodextrina:sólidos solúveis). Cada mistura foi homogeneizada com a ajuda de um Ultraturrax (Tecnal modelo TE-120) na velocidade 4 durante 7 minutos (Adaptado de SAÉNZ *et al.*, 2009). A solução foi então congelada a -80° C e posteriormente liofilizada como mostra o fluxograma da Figura 6.

**Figura 6.** Fluxograma de obtenção do extrato de palma forrageira adicionado de maltodextrina.



Fonte: próprio autor

#### 4.7.2 Umidade

A análise de umidade foi realizada em balança determinadora de umidade da (marca MARTE, modelo ID50).

#### 4.7.3. Higroscopicidade

A análise de higroscopicidade foi determinada por meio da pesagem de 1,0 g de pó posteriormente espalhado uniformemente sobre uma placa de Petri colocada em dessecador por 90 min, segundo Goula e Adamopoulos (2008), sob condições de 24 °C e 75% de umidade relativa utilizando solução saturada de NaCl. E calculada por meio da Equação 1:

$$H = \frac{X}{U \cdot a} \cdot 100 \quad \text{Equação 1.}$$

Onde, H = higroscopicidade (g de água absorvida/100g de sólidos); X = massa de água absorvida (g); U = umidade do pó em base seca (g/g); a = massa da amostra (g).

#### 4.7.4. Grau de *Caking*

Após a determinação de higroscopicidade, a amostra úmida foi levada à estufa a vácuo de 70 °C, com pesagens até peso constante. Após o resfriamento em dessecador, a amostra foi pesada e transferida para peneira com abertura de 500 µm e agitada por 5 min em agitador de peneiras eletromagnético (Bertel) sob agitação média. O peso do pó retido na peneira foi pesado e o grau de caking calculado segundo Goula e Adamopoulos (2008), conforme Equação 2:

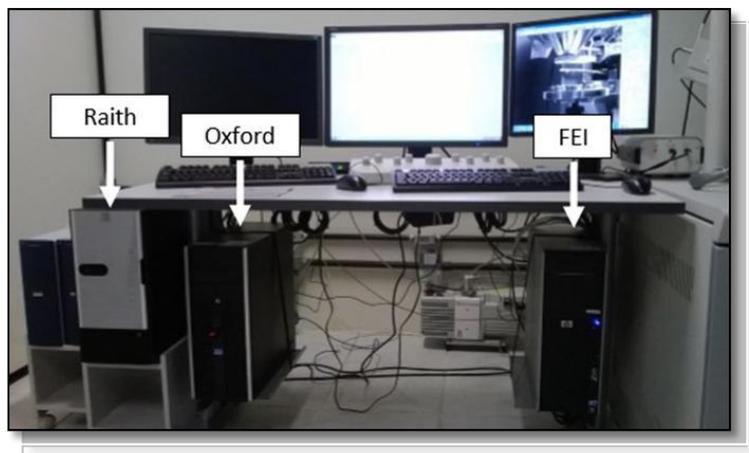
$$GC = \frac{100 \cdot a}{b} \quad \text{Equação 2.}$$

Onde, GC é o grau de *caking* (%), *a* é a massa do pó que ficou retido na peneira após agitação (g), e *b* é a massa de pó utilizado na peneiração(g).

#### 4.7.5. Estudo da morfologia do extrato encapsulado através da Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A morfologia e microestrutura do extrato encapsulado foram observadas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), Microscópio Inspect F50, sendo realizada na Central Analítica da UFC. O microscópio utilizado possui três computadores acoplados ao mesmo. O computador da esquerda (Figura 7) é o responsável pelo suporte ao programa de Litografia de elétrons (Raith); o computador central suporta a Microanálise de raios-X (Oxford); e o computador da direita suporta o programa básico de controle do microscópio (FEI).

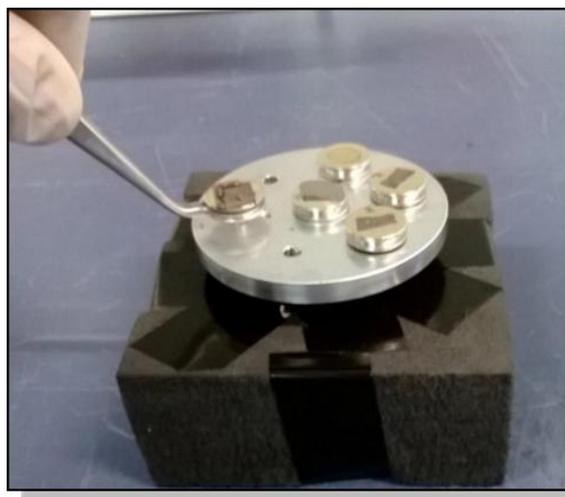
**Figura 7.** Computadores usados na operação do microscópio Inspect F50.



Fonte: Central Analítica – UFC.

Com a ajuda de fita colante as amostras são fixadas em “stubs”. As amostras foram então, metalizadas com ouro pelo sistema Quorum® Q150T ES e posteriormente inseridas nos orifícios do porta-amostra, Figura 8.

**Figura 8.** Inserção dos “stubs” no porta-amostra.

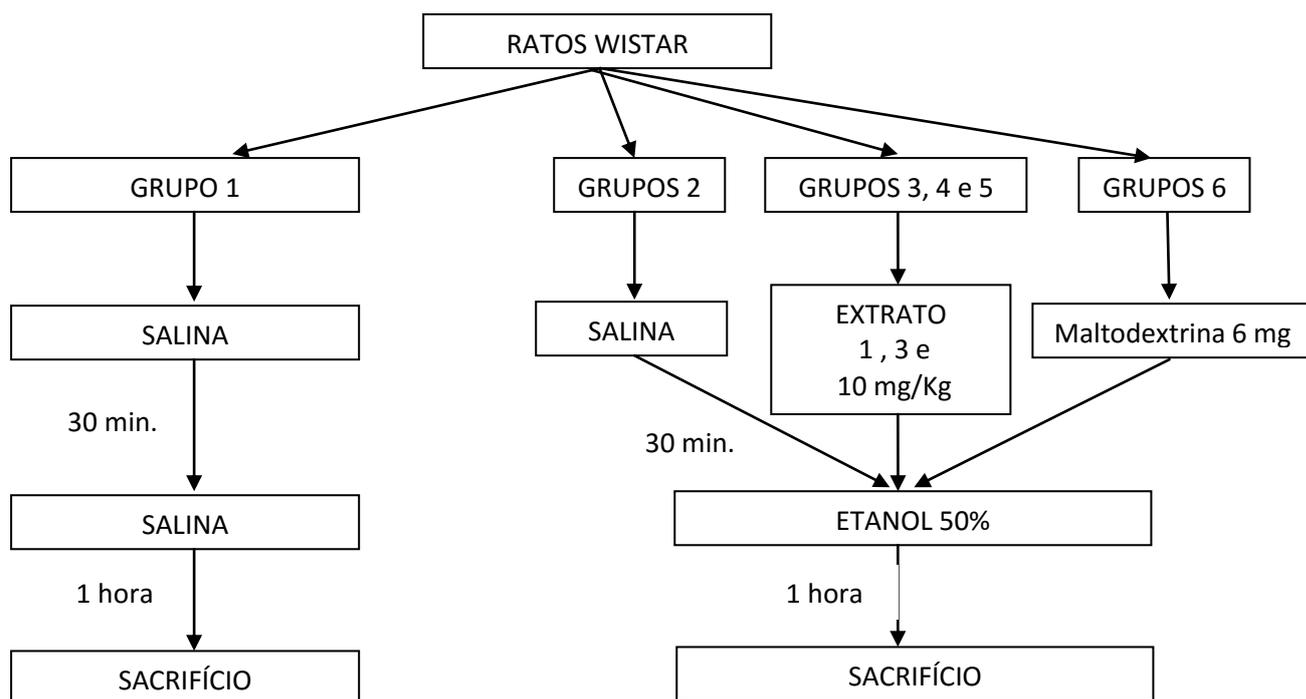


Fonte: Central Analítica – UFC.

## 5. Análises in vivo

As análises *in vivo* foram realizadas com o extrato de palma encapsulado conforme fluxograma da Figura 9.

**Figura 9.** Fluxograma da indução da lesão gástrica com etanol 50% em ratos Wistar.



Fonte: próprio autor.

### 5.1. Animais

Para o estudo *in vivo* foram utilizados ratos Wistar, de ambos os sexos, pesando entre 180 e 220 g. Eles foram colocados em caixas, num ambiente com temperatura de  $22 \pm 2^{\circ}\text{C}$  num ciclo de 12h luz/12h escuro. Os animais foram privados de alimento por 18h antes dos experimentos, tendo acesso livre a água. Os ratos foram fornecidos pelo Biotério Central da Universidade Federal do Ceará – UFC e pelo Biotério Setorial do Departamento de Fisiologia e Farmacologia - UFC. Os protocolos experimentais estão de acordo com os padrões de uso de animais experimentais e esse estudo foi enviado

para apreciação do comitê de Ética em Pesquisa animal da UFC, sendo aprovado com o protocolo número: 31/2015.

## 5.2 Grupos de animais

Os animais foram divididos em 6 grupos com 6 animais cada:

**Grupo controle:** os animais foram tratados com salina (0,5 mL via oral);

**Grupo etanol:** os animais receberam solução de etanol 50% (0,5 mL v.o.).

**Grupo extrato (1 mg/Kg) e úlcera péptica induzida por etanol:** os animais receberam 0,5 mL via oral de 1 mg/Kg de extrato de palma diluídos em 0,5 mL de H<sub>2</sub>O cada. Após 30 minutos receberam etanol 50% (0,5 mL v. o.).

**Grupo extrato (3 mg/Kg) e úlcera péptica induzida por etanol:** os animais receberam 0,5 mL via oral de 3 mg/Kg de extrato de palma diluídos em 0,5 mL de H<sub>2</sub>O cada. Após 30 minutos receberam etanol 50% (0,5 mL v. o.).

**Grupo extrato (10 mg/Kg) e úlcera péptica induzida por etanol:** os animais receberam 0,5 mL via oral de 10 mg/Kg de extrato de palma diluídos em 0,5 mL de H<sub>2</sub>O cada. Após 30 minutos receberam etanol 50% (0,5 mL v. o.).

**Grupo maltodextrina e úlcera péptica induzida por etanol:** A maltodextrina foi testada na proporção equivalente a 3 mg/Kg do extrato de palma puro, no extrato encapsulado com maltodextrina. Logo, na proporção (2:1), extrato: maltodextrina, respectivamente, para se obter 3 mg do extrato, são necessários 9 mg do encapsulado, ou seja, são utilizados nesse caso, 6 mg de maltodextrina. Sendo assim, para avaliar se a maltodextrina interfere, no que se diz respeito à ação antioxidante, do extrato de palma encapsulado, os animais receberam 0,5 mL da solução de maltodextrina (6 mg/Kg, v.o.). Após 30 minutos receberam etanol 50% (0,5 mL v. o.).

## **5.2. Efeito do extrato de palma (*Opuntia ficus-indica*) no modelo de lesão gástrica por etanol em ratos**

Os ratos foram tratados com salina, extrato de palma 1 mg/Kg, 3 mg/Kg e 10 mg/Kg, e maltodextrina (6 mg/Kg) por gavagem. Após 30 min foi administrado etanol 50% (0,5 mL/Kg), também por gavagem. Os animais foram sacrificados 1 hora depois por deslocamento cervical e os estômagos foram removidos e abertos ao longo da grande curvatura. Em seguida, os estômagos foram fotografados com câmera digital para posterior análise das alterações macroscópicas com uso de um programa de planimetria computadorizada (Image J). Posteriormente, amostras do estômago foram retiradas, pesadas e congeladas à -80 °C, para determinação das dosagens de grupos sulfidrilas da glutathione (GSH) e malonildialdeído (MDA). Uma outra amostra de tecido foi retirada e colocada em formol 10% e após 24h armazenada em etanol 70% para análise histopatológica (KO e CHO, 1998).

## **5.3. Análise histopatológica da mucosa gástrica de ratos tratados com extrato de palma (*Opuntia ficus-indica*) encapsulado no modelo de lesão gástrica por etanol em ratos**

Para a avaliação histopatológica, uma amostra da mucosa gástrica dos ratos foi fixada em uma solução de formaldeído 10%, onde permaneceu por 24 horas. Em seguida as amostras foram transferidas para uma solução de etanol 70%, onde permaneceram até a realização dos procedimentos histológicos. Inicialmente, as mucosas foram seccionadas e embebidas em parafina. Secções de 4 micrometros foram removidas da parafina, colocadas numa lâmina e coradas com hematoxilina-eosina e em seguida examinadas através de um microscópio óptico. As amostras foram avaliadas de acordo com os critérios de Laine e Weinstein (1988). Em síntese, foi avaliada perda de células epiteliais (escores de 0 a 3), edema na superfície da mucosa (escores de 0 a 4), lesão hemorrágica (escores de 0 a 4) e infiltração de células inflamatórias (escores de 0 a 3), sendo 14 o escore máximo. Toda a avaliação histopatológica foi realizada através de um estudo cego por um histopatologista experiente.

#### **5.4. Determinação da concentração de glutathiona (GSH) na mucosa gástrica de ratos tratados com extrato de palma (*Opuntia ficus-indica*) encapsulado e no modelo de lesão gástrica por etanol em ratos.**

A dosagem de GSH foi realizada através determinação dos grupos sulfidrílicos não protéicos (glutathiona) das amostras de tecidos gástricos de ratos submetidos aos tratamentos anteriores citados, de acordo com a metodologia descrita por Sedlak & Lindsay (1968). A determinação do GSH baseou-se na reação do DTNB, com o tiol livre originando o ácido 2-nitro-5-tiobenzóico. Inicialmente, 50-100 mg da mucosa gástrica foi homogeneizado em EDTA 0,02 M (1 ml/100 g de tecido) gelado. A uma alíquota de 400 µl do homogenato foi adicionado 320 µl de água destilada, e 80 µl de ácido tricloroacético (TCA) a 50%. Em seguida o material foi centrifugado a 3000 rpm por 15 minutos, seguido de agitação e filtração. Depois de centrifugado, 400 µl do sobrenadantes foram misturados a 800 µl de tampão Tris 0,4 M (pH 8.9) e, por fim, foi adicionado 20 µl de DTNB (5,5'-dithio-bis -2- ácido nitrobenzóico) a 0,01M. O material foi então agitado durante 3 minutos e a absorbância foi determinada a 412 nm, em espectrofotômetro. A concentração de GSH/g de tecido foi determinada a partir de uma curva padrão de glutathiona reduzida, processada de maneira semelhante. Os resultados foram expressos em µg de GSH/g de tecido.

#### **5.5. Determinação da concentração de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de ratos tratados com extrato de palma (*Opuntia ficus-indica*) encapsulado no modelo de lesão gástrica por etanol em ratos.**

O método mais empregado é baseado na sua reação com o ácido tiobarbitúrico (TBA). Nesta reação, duas moléculas de TBA reagem estequiometricamente com uma molécula de MDA para formar uma solução de cor rosa, que tem absorbância máxima em pH ácido em 532 a 535 nm. Os níveis de malondialdeído na mucosa gástrica foram determinados pelo método de Mihara e Uchiyama (1978). Fragmentos da mucosa gástrica de ratos submetidos aos tratamentos citados anteriormente foram homogeneizados com KCl gelado 1.15% para obtenção de um homogenato à 10%. Meio mililitro (0,5ml) do homogenato foi pipetado dentro de um tubo de centrífuga de 10 ml, contendo 3 ml de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> (1%) e 1 ml de uma solução aquosa de ácido

tiobarbitúrico aquoso (0,6%). Posteriormente, os tubos foram aquecidos, por um período de 45 minutos, em um banho de água fervendo e a mistura reacional foi, então, resfriada em um banho de água gelada, seguida da adição de 4 ml de n-butanol. Após a adição de n-butanol, as amostras foram agitadas por 40 segundos em um misturador "vortex", e depois centrifugados a 1200 rpm, por um período de 10 minutos. O sobrenadante foi mensurado a uma absorvância de 520 e 535 nm, em espectrofotômetro. Os resultados foram expressos em nmol/g de tecido gástrico.

## **5.6. Análise estatística**

A análise estatística foi realizada empregando o teste de análise de variância (ANOVA). Quando houve diferença significativa entre os grupos, foi realizado o teste de comparações múltiplas de Newman-Keuls. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  E.P.M (variáveis com distribuição normal) ou pela mediana  $\pm$  desvio padrão (variáveis sem distribuição normal), sendo as diferenças consideradas estatisticamente significativas quando  $p < 0,05$ .

## **6. Resultados e discussão**

### **6.1 Análises do extrato liofilizado de cladódio de palma forrageira**

#### **6.1.2 Teste de Rendimento em massa**

Na Tabela 1 são apresentados a média e os desvios padrões dos rendimentos em massa (base úmida) do extrato de palma forrageira nas proporções 2:1 e 1:1 (palma:água), com o sistema em repouso. É possível observar a importância da segunda extração para o aumento do rendimento total, que contribui com 33% na proporção 2:1 e 29% na proporção 1:1. A segunda extração promove uma espécie de lavagem da mucilagem, que por ser muito viscosa e com aparência semelhante à da clara de ovo, fica aderida aos pedaços de palma. Uma terceira extração não foi realizada, pois haveria uma pequena contribuição no rendimento total em relação à quantidade de água adicionada, o que não seria economicamente viável visto que a liofilização é um processo de custo elevado.

A Tabela 1 traz ainda o resultado da comparação entre as proporções testadas e mostra a diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos dois tratamentos, ou seja,

o rendimento da extração foi maior quando se utilizou a proporção 1:1 de palma e água. A proporção 1:1 promoveu uma melhor distribuição dos cladódios em pedaços na água, ocorrendo assim uma maior área superficial de extração, o que, com certeza, contribuiu com o maior rendimento obtido.

**Tabela 1.** Rendimentos (%) e comparação das extrações do extrato liofilizado de palma, considerando as proporções 2:1 e 1:1 (palma: água), sistema em repouso a temperatura ambiente.

Proporção (palma:água)	1ª extração	2ª extração	Total
02:01	1,08 ± 0,10	0,55 ± 0,06	1,64 ± 0,15*
01:01	1,63 ± 0,14	0,67 ± 0,05	2,30 ± 0,09

\*diferença significativa entre as amostras (análise de variância e teste F,  $p < 0,05$ )

Na tabela 2 são apresentados os rendimentos obtidos no teste com o sistema em agitação, que foi realizado apenas com a proporção de 1:1 (de palma e água), melhor rendimento obtido no estado de repouso.

A comparação entre o rendimento no sistema com e sem agitação é apresentada na Tabela 3. O resultado mostrou que não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as médias dos dois tratamentos, ou seja, a agitação não afetou o rendimento da extração.

**Tabela 2.** Rendimentos (%) das extrações do extrato liofilizado de palma, proporção 1:1 de palma e água, sistema em agitação, a temperatura ambiente.

Proporção	1ª extração	2ª extração	Total
1:1	1,55 ± 0,18	0,72 ± 0,03	2,27 ± 0,16

Fonte: próprio autor

**Tabela 3.** Comparação entre os rendimentos obtidos, considerando a agitação e o repouso do sistema, a temperatura ambiente.

Estado	Rendimento Total (%)
Repouso	2,30 <sup>ns</sup>
Agitação	2,27

<sup>ns</sup>diferença não significativa entre as amostras (análise de variância e teste F,  $p < 0,05$ )

Fonte: próprio autor

Os resultados mostram que os rendimentos das extrações em repouso (2,30%) e sob agitação (2,27%) foram superiores aos encontrados na literatura, considerando o rendimento apresentado por Díaz *et al.* (2010), de apenas 0,68% (base úmida) e o apresentado por Ramírez *et al.* (2006) de 2,05%, o que confirma a importância da realização de uma segunda extração.

Nas condições testadas, conclui-se que a extração aquosa da palma realizada em duas etapas consecutivas, na partir proporção 1:1 (palma e água), apresenta maior rendimento. O rendimento médio (base úmida) do extrato liofilizado obtido foi de 2,30% em relação à massa inicial da palma.

Ao avaliar os resultados obtidos para o rendimento em massa é de suma importância levar em consideração o efeito do congelamento dos cladódios de palma antes da extração de sua mucilagem. Foi observado que o congelamento prévio a -18 °C teve impacto positivo sobre o rendimento.

Durante o congelamento lento há a formação de cristais que surgem inicialmente nos espaços intercelulares, o aumento do material extracelular promove a saída do material intracelular por osmose. Em grande número e com o aumento do tamanho, esses cristais promovem lesões nas membranas e desidratação das células. Assim, durante o descongelamento as células não são capazes de recuperar seu nível de hidratação, perdendo seu conteúdo por gotejamento (drip loss), modificando a textura e a turgidez do produto, sendo esse processo o mais pronunciado em tecidos de origem vegetal (GAVA, SILVA e FRIAS, 2009). O que neste caso é um efeito benéfico, pois há um aumento da extração do material de interesse quando os cladódios são congelados.

### **6.1.3 Análise de viabilidade celular através do ensaio de MTT *in vitro***

Através das densidades óticas obtidas por espectrofotometria é possível verificar que a administração do extrato de palma nas concentrações de 25 e 100% houve um aumento significativo na multiplicação celular quando comparado ao Branco, meio que continha apenas meio de cultura para as células. O percentual de viabilidade celular, determinado utilizando a cultura IEC-6, aponta para um efeito não-citotóxico do extrato

de palma forrageira. O resultado desta análise traz segurança para continuar com o estudo em questão, uma vez que se trata de um material seguro à saúde.

**Tabela 4.** Viabilidade celular (cultura IEC-6) expressa em densidade ótica (DO), a partir do ensaio MTT.

Concentração	DO (570nm)
Branco	0,208±0,047 <sup>b</sup>
Palma 100%	0,293±0,056 <sup>a</sup>
Palma 75%	0,307±0,019 <sup>a</sup>
Palma 50%	0,364±0,094 <sup>a</sup>
Palma 25%	0,271±0,033 <sup>a</sup>
Palma 12,5%	0,213±0,011 <sup>b</sup>

Valores denotam média ± erro padrão, respectivamente. Teste de Kruskal- Wallis.

(a)  $p < 0,05$ , quando comparado com o Branco.

Fonte: próprio autor.

#### 6.1.4 Análise por UPLC-ESI-TOF-MS/MS (QTOF)

A partir da análise QTOF, Cromatografia Líquida de Ultra Performance e espectros de massa, do extrato liofilizado de palma forrageira foi possível identificar vários compostos fenólicos e alguns aminoácidos em modo de ionização negativo, no qual as moléculas são ionizadas perdendo um próton (íon  $H^+$ ) e adquirem carga negativa. No modo de ionização positivo a ionização acontece pela adição de um próton (íon  $H^+$ ) adquirindo carga positiva (WILSON e WALKER, 2010).

A Tabela 5 mostra os aminoácidos identificados em modo de ionização positivo, enquanto as Tabelas 6 e 7 trazem uma lista de compostos fenólicos e ácidos orgânicos identificados nos modos positivo e negativo.

Nesta análise foi possível identificar a presença de alguns polifenóis como os flavonóides quercetina, rutina e isorhamnentina, metabólitos secundários de vegetais com potenciais propriedades na promoção da saúde (MACIEJ *et al.*, 2015). Muitos estudos mostram uma relação muito estreita entre o consumo de vegetais ricos em polifenóis, como os flavonóides, e a redução dos riscos de doenças degenerativas, como o câncer e doenças cardiovasculares (AYOUB *et al.*, 2014).

A isorhamnetina e seus derivados têm sido estudados por diferentes autores e está associada a diversas propriedades farmacológicas e múltiplos efeitos benéficos para

a saúde como atividade contra lesões celulares e câncer de pele (KIM *et al.*, 2013; BAO e LOU, 2006; ZHANG *et al.*, 2011). O glicosídeo isorhamnetina-3-O-rutinosídeo, identificado na amostra em estudo (Tabela 7) exibe potenciais efeitos antimicrobianos e efeito positivo contra células de eritroleucemia mielóide em humanos (AGNESE, PÉREZ e CABRERA, 2001). Além disso, a atividade anti-tumoral da isorhamnetina-3-O-rutinosídeo e isorhamnetina-3-O-glucosídeo pode ser comparável ou ainda mais forte do que a atividade do polifenol presente no chá verde, galato de epigallocatequina (BOUBAKER *et al.*, 2011; ITO *et al.*, 1999; AGNESE, PÉREZ e CABRERA, 2001).

Dodda, Chhajed e Mishra (2014) relatam que a quercetina possui atividade anti-diabética, anti-úlceras e anti-hipertensiva, além de propriedades antidepressivas e anti-inflamatórias, agindo sobre diversas vias celulares. Nava *et al.* (2014) analisaram o perfil de polifenóis (agliconas) de cladódios de palma forrageira provenientes do México. O resultado do HPLC-MS (Cromatografia líquida de alta performance acoplada a espectrômetro de massas) apontou a presença de três polifenóis: quercetina, Campferol e a isorhamnetina. Son *et al.* (2014), através do LCMS QTOF (Cromatografia líquida-espectrometria de massa; quadrupolo de tempo-de-vôo) conseguiu identificar no fruto da palma cultivada na Coreia em modo negativo os compostos fenólicos campferol (aglicona), campferol-7-O-neohesperidosídeo, campferol-3-O-glucosídeo, isorhamnetina-3-O-rutinosídeo, isorhamnetina-3-O-glucosídeo, quercetina (aglicona) e quercetina-3-metiléter. Esses resultados apontam semelhança no teor de compostos bioativos do fruto e nos cladódios de palma.

Ao ácido ferúlico, identificado no modo negativo (Tabela 7), são conferidas várias ações preventivas relacionadas a diferentes tipos de doenças, como efeito neuroprotetor, efeito radioprotetor, efeito de proteção pulmonar e efeito anti-aterogênico, além disso, também tem sido relacionado a redução do nível de alguns mediadores inflamatórios como a prostaglandina E2 e a TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral alfa) (SOBRATTEE, 2005; BEECHER, 1998). Recentemente, um estudo realizado por Maruf *et al.*, (2015) sugere que o ácido ferúlico e os polifenóis relacionados podem ser utilizados terapêuticamente para inibir ou diminuir as reações citotóxicas e o estresse oxidativo.

Casa *et al.*, (2000) discutem em seu estudo o efeito protetor da rutina, flavonoide de ocorrência natural também identificado no extrato de palma analisado, contra lesões

induzidas por etanol 50%. Os resultados obtidos confirmam que a rutina a uma dose de 200 mg/kg tem um efeito protetor, reduzindo significativamente a lesão da mucosa gástrica produzida por instilação intragástrica do agente necrotizante e aumentando a atividade da glutathione (GSH). Ao mesmo tempo em que mostraram uma diminuição significativa dos níveis na peroxidação lipídica.

Mais recentemente, uma pesquisa feita por Nafees *et al.*, (2015), foi demonstrado o potencial preventivo da rutina contra a toxicidade hepática induzida em ratos Wistar pelo uso da Ciclofosfamida, também chamada Citoxan (um fármaco anticancerígeno, amplamente usado no tratamento de vários tipos de câncer e desordens auto-imunes). De acordo com os autores do estudo citado, esse efeito atenuador da rutina é devido ao seu potencial antioxidante e antiinflamatório, que protegeu as células normais contra a toxicidade induzida pela Ciclofosfamida.

**Tabela 5.** Aminoácidos identificados pelo UPLC-ESI-TOFMS/MS (QTOF) em modo positivo no extrato de palma liofilizado.

<b>Pico</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Composto</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> Experimental</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> Cálculado</b>	<b>MS/MS Fragmentos</b>	<b>Erro (ppm) Negativo</b>	<b>i-Fit</b>
1	0,80	Leucina/Isoleucina	C <sub>6</sub> H <sub>14</sub> O <sub>2</sub>	132,1028	132,1025	-	2,3	0,0
2	2,14	Histidina	C <sub>6</sub> H <sub>10</sub> N <sub>3</sub> O <sub>2</sub>	156,0778	156,0773	-	3,2	0,0
3	2,19	Fenilalanina	C <sub>9</sub> H <sub>12</sub> NO <sub>2</sub>	166,0869	166,0868	-	0,6	0,0
4	2,7	Triptofano	C <sub>11</sub> H <sub>13</sub> N <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	205,0987	205,0977	-	4,9	0,0

Fonte: próprio autor.

**Tabela 6.** Substâncias identificadas pelo UPLC-ESI-TOFMS/MS (QTOF) em modo positivo.

<b>Pico</b>	<b>Tempo de Retenção</b>	<b>Composto</b>	<b>Fórmula Molecular</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> Experimental</b>	<b>[M+H]<sup>+</sup> Cálculado</b>	<b>MS/MS Fragmentos</b>	<b>Erro (ppm) Negativo</b>	<b>i-Fit</b>
5	3,71	Rutina	C <sub>27</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	611,1608	611,1612	465,1080; 303,0490	-0,7	1,1
6	3,72	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	303,0503	303,0505	-	-0,7	0,0
7	3,73	Quercetina O-glucosídeo	C <sub>21</sub> H <sub>21</sub> O <sub>12</sub>	465,1049	465,1033	303,0496	3,4	0,5
8	4,00	Campferol-3-O-robinosídeo-7-O-ramnosídeo / Robinin	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>19</sub>	741,2263	741,2242	287,0556	2,8	0,0
9	4,05	Isorhamnetina-3-O(2'',3''-diramnosil) glucosídeo	C <sub>34</sub> H <sub>43</sub> O <sub>20</sub>	771,2335	771,2348	625,1743; 479,1167; 317,0640	-1,7	0,0
10	4,05	Luteolina	C <sub>15</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	287,0556	287,0556	-	0,0	0,0
11	4,06	Petunidina 3-glucosídeo	C <sub>22</sub> H <sub>23</sub> O <sub>12</sub>	479,1173	479,1190	317,0647	-3,5	0,0
12	4,08	Isorhamnetina-3-O-ramnosil-glucosídeo	C <sub>28</sub> H <sub>33</sub> O <sub>16</sub>	625,1770	625,1769	479,1182; 317,0640	0,2	0,0
13	4,10	Chrysoeriol glucosídeo-xilosil glucosídeo 2	C <sub>33</sub> H <sub>41</sub> O <sub>20</sub>	757,2244	757,2191	625,1737; 479,1118	-5,4	0,9

Fonte: próprio autor.

**Tabela 7.** Substâncias identificadas pelo UPLC-ESI-TOFMS/MS (QTOF) em modo negativo.

Pico	Tempo de Retenção	Composto	Fórmula Molecular	[M-H] <sup>-</sup> Experimental	[M-H] <sup>-</sup> Cálculado	MS/MS Fragmentos	Erro (ppm) Negativo	i-Fit
1	2,30	3,4- dihidroxi -5- Ácido metoxicinâmico	C <sub>11</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	255,0510	255,0505	193,0504; 179,0331; 165,0524	2,0	0,4
1	2,3	Ácido Cafeico	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	179,0331	179,0344	135,0414	-7,3	0,0
2	2,73	4- Ácido Cafeoilquínico	C <sub>16</sub> H <sub>17</sub> O <sub>9</sub>	353,0875	353,0873	307,1030; 179,0468; 163,0470	0,6	0,0
3	2,82	Ácido Ferulico	C <sub>10</sub> H <sub>9</sub> O <sub>4</sub>	193,0512	193,0501	179,0463; 161,0532	5,7	0,0
4	3,69	Ácido 4'O-Acetillogânico	C <sub>19</sub> H <sub>27</sub> O <sub>10</sub>	415,1616	415,1604	269,1024; 161,0406; 153,0950	2,9	0,0
5	3,96	Sinapoylgentiobiose	C <sub>23</sub> H <sub>31</sub> O <sub>15</sub>	547,1653	547,1663	223,0659	-1,8	0,0
6	4,35	Guttiferones K	C <sub>27</sub> H <sub>29</sub> O <sub>6</sub>	449,1978	449,1964	269,1388; 119,0370	3,1	0,0
7	4,35	Isorhamnetina-deoxyhexosyl-hexosídeo	C <sub>28</sub> H <sub>31</sub> O <sub>16</sub>	623,1603	623,1612	449,1993; 269,1344	-1,4	0,0
8	5,97	Quercetina	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>7</sub>	301,0344	301,0348	178,9923; 151,0028	-1,3	0,0

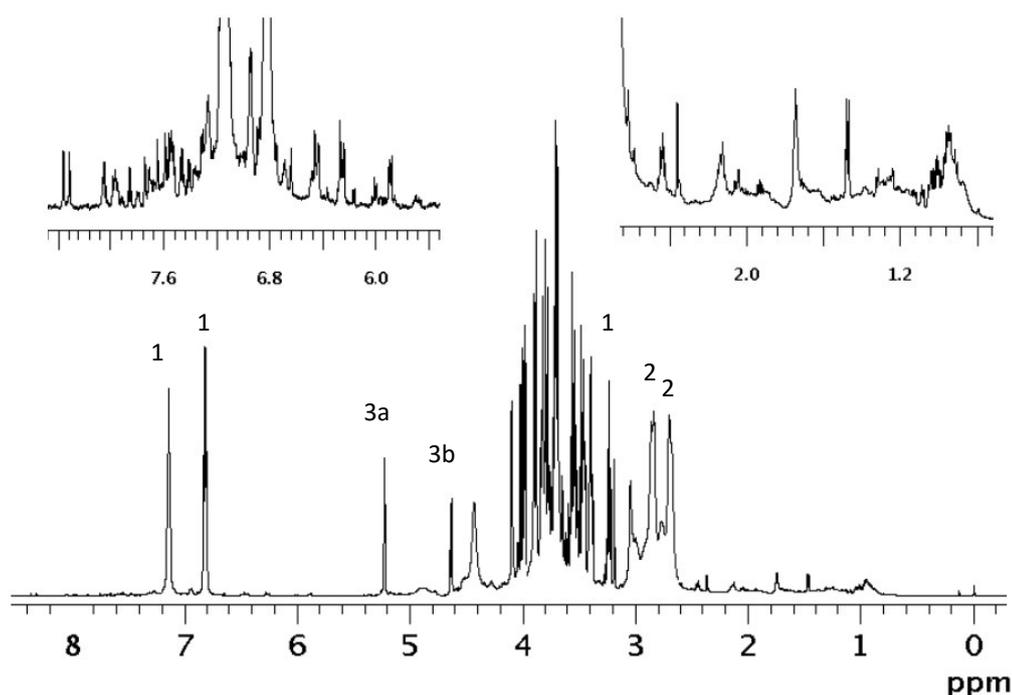
Fonte: próprio autor.

### 6.1.5 Análise por Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

Produtos naturais são constituídos de uma coleção combinatória de compostos químicos com alta diversidade estrutural. A identificação de alto rendimento de pequenas moléculas presentes no metabolismo de plantas é importante para ter uma visão completa da composição nutricional, principalmente se a planta é usada em formulações de medicamentos ou suplementos alimentares. Assim, um estudo detalhado dos principais metabolitos presentes no extrato liofilizado do cladódio da palma através do RMN foi realizado.

O espectro  $^1\text{H}$  RMN é relatado na Figura 10. As inserções estão relacionados com as regiões de alto e baixo campo, 1,70-2,60 ppm e 5,50-8,50 ppm, respectivamente.

**Figura 10.** Espectro  $^1\text{H}$  RMN dos principais metabólitos no extrato de palma. 1 – Tirosina; 2 – Ácido málico; 3a –  $\alpha$  – Glucose; 3b –  $\beta$  - Glucose.



Fonte: próprio autor.

O espectro de  $^1\text{H}$  reflete a complexidade da amostra, que é dominada por ressonâncias que derivam de aminoácidos incluindo valina, treonina, arginina, alanina, colina e tirosina, a ácidos orgânicos: ácido gama-aminobutírico (GABA) e ácido succínico a partir de 0,8 a 3,1 ppm, carboidratos de 3,1 a 5,3 ppm que incluem  $\alpha$  e  $\beta$ -glucose e aminoácidos com cadeia lateral aromática em 5,8 a 8,5 ppm com a fenilalanina. É possível constatar que o extrato

apresenta elevado teor do aminoácido tirosina, ácido málico e do carboidrato glicose. Apesar da caracterização de inúmeros compostos, é notável a presença de vários compostos aromáticos desconhecidos (5,8 a 8,5 ppm) que podem indicar a existência de compostos bioativos como os polifenóis e vitaminas, substâncias com capacidade antioxidante. As informações dos sinais  $^1\text{H}$  e  $^{13}\text{C}$  estão disponíveis na Tabela 8.

**Tabela 8.** Sumario da composição nutricional identificada no extrato de *O. ficus-indica*.

Metabólito	$\delta^1\text{H}$ (mult., J in Hz)	$\delta^{13}\text{C}$
$\alpha$ -glicose	5,16 (d, 3,7)	93,7
$\beta$ -glicose	4,54 (d, 7,8)	97,9
Alanina	1,47 (d, 7,2)	19,2
	3,8*	53,7
Treonina	1,1 (d, 6,6)	21,1
	4,2*	71,3
Valina	1,03 (d, 7,2)	19,6
	0,99 (d, 7,2)	19,1
Leucina	0,97 (d, 6,0)	25,0
	0,95 (d, 6,0)	24,0
	1,73*	42,1
Arginina	1,72-1,77 (m)	27,3
	2,09-2,18 (m)	29,3
	3,04*	72,7
	3,77*	57,6
Ácido gama-aminobutírico	1,90*	25,6
	2,45 (t, 7,2)	35,0
	3,2*	44,0
Colina	3,18 (s)	56,8
Ácido malice	2,64 (dd, 7,2; 16,2)	43,11
	2,79 (dd, 4,3; 16,2)	43,11
	4,36-4,50*	71,8
Tirosina	6,65 (d, 8,4)	115,6
	7,1 (d, 8,4)	132,4
	3,0	39,9

Fonte: próprio autor.

Os aminoácidos (aa) são utilizados para a síntese de proteínas e diversos compostos de baixo peso molecular e de enorme importância fisiológica. Em 1912, Abderhalde classificou os aa em nutricionalmente essenciais (eaa) e não essenciais (neaa). Os neaa, por exemplo, são metabolicamente versáteis e participam de diversas funções no organismo como a lactação, reprodução, integridade intestinal, expressão gênica, secreção hormonal, balanço ácido-básico, circulação sanguínea etc. Por muitos anos presumiu-se que os aa considerados não essenciais são produzidos em quantidades suficientes em humanos e animais para o crescimento saudável e com saúde, no entanto não há dados experimentais para fundamentar essa suposição. Segundo Hou, Yin e Wu (2015), atualmente os aa são distribuídos nos dois grupos da seguinte forma: eaa - histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilalanina, treonina, triptofano e valina. Já os aminoácidos classificados como não essenciais (neaa) são alanina, arginina, asparagina, aspartato, cisteína, glutamato, glutamina, glicina, prolina, serina, taurina, tirosina. Porém a arginina pode ser considerada como aa semiessencial ou condicionalmente essencial, dependendo do estado de saúde do indivíduo.

A partir do espectro de  $^1\text{H}$  foi possível identificar na amostra a presença de aa considerados essenciais como a treonina, valina e arginina e a presença de aa não essenciais como a alanina, arginina e a treonina, sendo a tirosina o aa presente em maior concentração.

A função dos aa no corpo humano é bastante variável e, de acordo com Wu (2009), a tirosina participa das reações de fosforilação, nitrosação e sulfatação das proteínas, este aa age ainda como um neurotransmissor e na regulação das respostas imunes no corpo humano, além de possuir ação antioxidante e de atuar na inibição de citocinas inflamatórias e superóxidos. Segundo os autores do estudo, a deficiência de tirosina pode causar ansiedade, depressão e outras desordens correlacionadas (LEYTON, et al. 2000).

Além dos aminoácidos, também foram identificados outros nutrientes como a colina, que é um nutriente essencial e que faz parte do complexo B das vitaminas. A colina participa de várias funções biológicas vitais com papel importante no desenvolvimento fetal, contribuindo com a função da membrana celular e da síntese da acetilcolina, um neurotransmissor amplamente distribuído e grande importância na manutenção ou modulação da atividade do sistema nervoso central, além de também estar presente nos sistemas periféricos, autônomo, entérico e tendo relação direta com a memória (VILLAÇA; FILGUEIRAS E MANHÃES, 2011; JIANG *et al.*, 2014). Alimentos de origem animal geralmente são melhores fontes de colina, quando comparados com os alimentos de origem

vegetal. Dietas com baixa ingestão de colina estão associadas a maior risco de câncer de mama, além disso, mulheres grávidas com deficiência de colina têm mais probabilidade de ter um bebê com defeito do tubo neural (DTN) ou fenda palatina (ZEISEL E CAUDILL, 2010).

O ácido gama-aminobutírico (GABA, sigla em inglês) também identificado no extrato de palma é um ácido aminobutírico e é o principal neurotransmissor inibidor no sistema nervoso central dos mamíferos. É considerado uma molécula multifuncional com uma grande variedade de funções fisiológicas em tecidos e órgãos fora do cérebro (WATANABE *et al.*, 2002).

O ácido málico é um ácido orgânico, encontrado naturalmente em frutas, como maçã e pêra e possui muitas propriedades atraentes para a indústria química e no desenvolvimento da medicina (ZHANG *et al.*, 2011). O ácido málico é um aditivo alimentar permitido e frequentemente adicionado a produtos alimentícios. Este ácido orgânico também tem sido usado para o alívio da dor, fibromialgia e síndrome de fadiga crônica (EUROPEAN FOOD SAFETY AUTHORITY, 2014; RUSSELL *et al.*, 1995 citado por ALAKOLANGA, et al 2015).

#### **6.1.6 Enzimas antioxidantes e atividade antioxidante total.**

As enzimas SOD e CAT em virtude da sua capacidade de catalisar as reações de desproporcionação dos seus substratos, radical superóxido e peróxido de hidrogênio, respectivamente, constituem um sistema de defesa antioxidante (OLIVEIRA *et al.*, 2011b; ARAÚJO *et al.*, 2015).

Tanto a dismutase do superóxido (SOD) e catalase (CAT) são consideradas uma defesa enzimática adicional contra as espécies reativas de oxigênio (EROS). Sua avaliação em condições patológicas é importante devido ao metabolismo oxidativo e intensa geração de radicais livres, sendo a CAT uma proteção mais específica contra o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e a SOD atuando contra o superóxido (O<sub>2</sub><sup>-</sup>) (BARBOSA *et al.*, 2006).

A presença de tais enzimas no extrato de palma forrageira (Tabela 9) associada aos compostos bioativos, como os polifenóis identificados (Tabelas 6 e 7), conferem ao extrato analisado um potencial antioxidante que posteriormente pode ser comparado e servir de base para a análise dos resultados dessas enzimas *in vivo*.

**Tabela 9.** Resultados obtidos para a análise de proteínas, análises enzimáticas e análises enzimáticas e análise da atividade antioxidante total (AAT).

<b>SOD</b> UAE. mg <sup>-1</sup> de proteína	<b>CAT</b> μmol H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> . mg <sup>-1</sup> de proteína min <sup>-1</sup>	<b>AAT</b> μM Trolox. g <sup>-1</sup> MS
19,92	1,18	50,73

\* UAE: unidade de atividade enzimática; SOD: dismutase do superóxido; CAT: catalase; AAT: atividade antioxidante total.

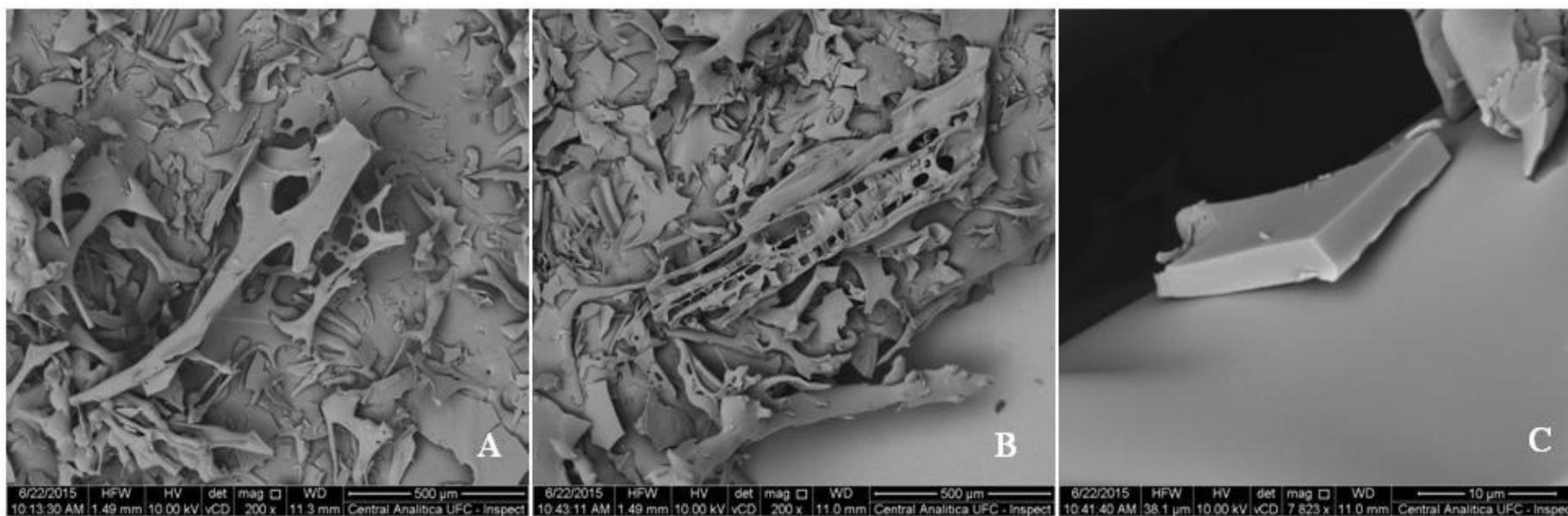
Fonte: próprio autor.

## 6.2 Análises do extrato liofilizado adicionado de maltodextrina

### 6.2.1. Análise de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

É possível observar nas Figuras 10 (A), (B) e (C), obtidas através da Microscopia Eletrônica de Varredura, que o extrato de palma encapsulado por liofilização apresentou formato irregular e superfície lisa. Este resultado é semelhante ao alcançado por Laine *et al.* (2008) e por Man, Irwand e Abdullah (1999), os quais relatam que cápsulas típicas daquelas preparadas por liofilização apresentam superfícies lisas e estruturas semelhantes a flocos. Este resultado mostra que houve a encapsulação do extrato de palma pelo material de parede, a maltodextrina. Com a encapsulação foi possível estabilizar o material liofilizado, através da redução dos níveis de higroscopicidade e do grau de *caking* (Tabela 10); viabilizando assim, a sua utilização nas análises *in vivo*. A MEV não nos traz informações suficientes para diferenciar o benefício de cada proporção analisada, todavia as diferenças dessas proporções serão discutidas no item 6.2.2 através das análises de umidade, higroscopicidade e grau de *caking*.

**Figura 11.** Microscopia Eletrônica de Varredura do extrato de palma liofilizado adicionado de maltodextrina: na proporção (2 malto:1 palma) (A), na proporção (3 malto:1 palma) (B) e (3 malto:1 palma) (C).



Fonte: Central Analítica – UFC.

### 6.2.2 Umidade, Higroscopicidade e Grau de Caking

Os elementos analisados na Tabela 10 estão diretamente relacionados. O *caking* é o processo pelo qual um pó de baixa umidade vai se aglomerando, e acaba por formar um material pastoso e pegajoso, resultando em perda de funcionalidade e qualidade (AZEREDO, 2012). Esta afirmação pode ser constatada quando os dados presentes na Tabela acima são correlacionados. O pó que apresenta o menor teor de umidade (proporção 1:1) é o que apresenta as maiores taxas de higroscopicidade e grau de *caking* quando comparado aos pós com proporção (2:1) e (3:1) maltodextrina: palma, respectivamente.

Os resultados obtidos para a proporção (1:1) confirmam o que foi visto em prática. Um material sem nenhuma estabilidade, que em questão de segundos apresentava alteração de cor e textura, tornando-se um material escuro e pastoso, o que impossibilitava o desenvolvimento de um estudo em longo prazo. Esse resultado também leva a constatação da importância da proporção ideal do adjuvante de secagem utilizado, uma vez que não foi observado mudanças de cor e textura com a mesma velocidade no material encapsulado nas proporções (2:1) e (3:1) maltodextrina: extrato de palma.

Como as proporções (2:1) e (3:1) maltodextrina: extrato de palma não diferiram entre si, a nível de 5% de significância, o material escolhido foi o que continha a menor quantidade de maltodextrina, proporção (2:1), para a realização das demais análises e prosseguimento do estudo.

**Tabela 10.** Resultado da análise de umidade, higroscopicidade e grau de *caking* para o extrato encapsulado.

<b>Proporção (maltodextrina: extrato de palma)</b>	<b>Umidade (%)</b>	<b>Higroscopicidade (%)</b>	<b>Grau de <i>Caking</i> (%)</b>
(1:1)	2,87 ± 0,23B	2,62 ± 0,35 <sup>a</sup>	70,65 ± 3,16A
(2:1)	5,74 ± 0,42A	1,48 ± 0,18B	48,34 ± 5,22B
(3:1)	5,13 ± 0,70A	1,90 ± 0,22AB	50,55 ± 1,94B

Na coluna, médias seguidas de letras iguais não diferem significativamente entres si (Tukey, 5%).

Fonte: próprio autor.

## 7. Resultados das análises *in vivo*.

### 7.1. Lesão gástrica

O etanol é altamente difusível através das membranas celulares, assim sua toxicidade afeta a maioria dos órgãos (SCHNEIDER, 2015). A oxidação está naturalmente presente nos processos metabólicos de células humanas que podem ser exacerbadas por substâncias pró-oxidantes ou radicais livres que desencadeiam o estresse oxidativo (ARAÚJO *et al.*, 2015).

O efeito prejudicial do etanol 50% pode ser observado no modelo experimental de estresse oxidativo, onde facilmente é diagnosticado através de uma análise histológica da mucosa gástrica, pois provoca lesões hemorrágicas agudas, quando comparado ao grupo controle (salina) (Figuras 12 e 13). É possível observar nessas figuras, que os animais tratados apenas com salina não apresentaram lesão na mucosa gástrica, enquanto que a administração do etanol, na concentração de 50%, resultou no aparecimento destas lesões. O pré-tratamento com o extrato de palma, nas três doses testadas (1, 3 e 10 mg/kg de peso corporal), reduziu de forma significativa, a lesão gástrica provocada pela administração do etanol 50%, comprovadas pela avaliação macroscópica (Figura 13).

O desarranjo nas glândulas gástricas com perdas das células epiteliais, edema, hemorragia e intensa infiltração de células inflamatórias provocados pelo etanol 50% podem ser visualizados na Figura 14 (painel B), a nível microscópico, assim como na Tabela 11. O extrato de palma forrageira diminuiu de forma significativa os parâmetros avaliados como hemorragia, edema, perda de células epiteliais e a infiltração de células inflamatórias induzidas pelo etanol 50% (Figura 14, painéis C, D e E, e na Tabela 11).

O estresse oxidativo pode ser medido pela intensidade da peroxidação lipídica, uma vez que, as EROS atuam na degradação dos lipídeos constituintes das membranas celulares. O radical lipídico é instável e degrada-se muito rapidamente em produtos secundários. A maioria deles são aldeídos eletrófilos, tais como o MDA, que é o principal marcador do dano oxidativo nos lípidos insaturados das membranas celulares, conduzindo à oxidação de ácidos graxos e a formação do radical lípido (REED, 2011). Altos níveis de MDA indicam um aumento da peroxidação lipídica (KASHYAP *et al.*, 2005).

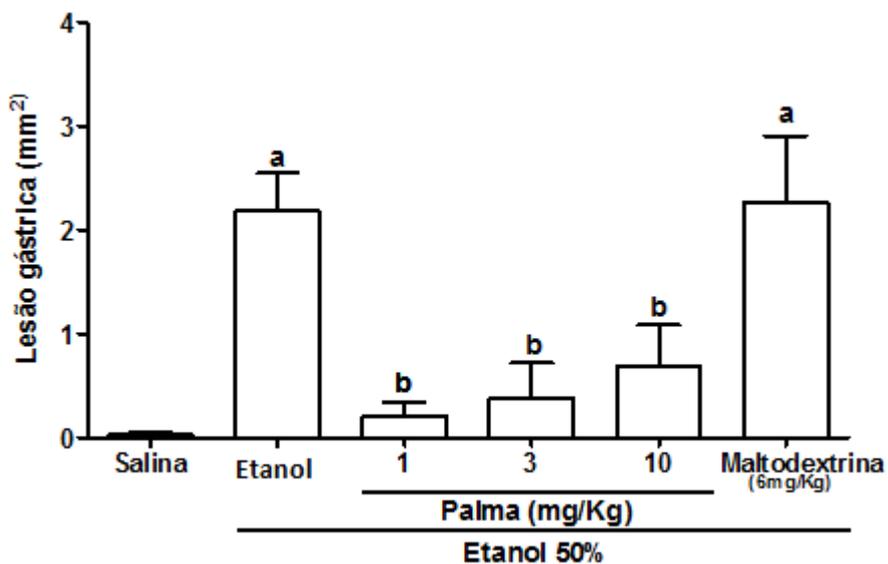
Na lesão gástrica por etanol 50% observamos um aumento significativo dos níveis de MDA (Figura 15), associado a uma diminuição significativa no nível de glutathiona (GSH) (Figura 16), quando comparados ao grupo controle (Figura 15 e 16, respectivamente). A administração do extrato de palma, nas três doses testadas: 1, 3 e 10 mg/kg de peso corporal,

diminuiu de forma significativa, a formação de MDA na gastropatia induzida pelo etanol 50%. Contudo, só foi possível observar a atividade antioxidante significativa, na determinação de GSH, na dose de 3mg/Kg do extrato de palma forrageira, quando comparado com o grupo etanol 50% (Figura 16).

A presença de enzimas antioxidantes como a CAT e a SOD (Tabela 9), e inúmeros compostos fenólicos identificados no extrato de palma forrageira (Tabelas 6 e 7) associados à ação do GSH, um dos agentes mais importantes do sistema de defesa antioxidante da célula, já que tem a função de destruir intermediários das EROs e dos radicais livres produzidos durante o metabolismo (GALLEANO e PUNTARULO, 1995), compreendem um potente sistema antioxidante que interrompe a reação de propagação dos radicais livres na peroxidação lipídica, sendo capaz de reduzir ou até inibir a ação danosa do etanol.

Como citado anteriormente, fez-se necessária à avaliação *in vivo* da maltodextrina, uma vez que ela faz parte do extrato encapsulado, como produto final. No entanto, é possível observar nas Figuras 12, 15 e 16 e nas Figuras 13 e 14 (painel F), que a mesma não apresenta efeito antioxidante contra o estresse oxidativo do etanol 50%, não interferindo, portanto, na ação antioxidante do extrato. Sendo assim, os resultados demonstram que o extrato de palma forrageira apresenta atividade antioxidante significativa no modelo experimental de estresse oxidativo com etanol 50% em ratos Wistar.

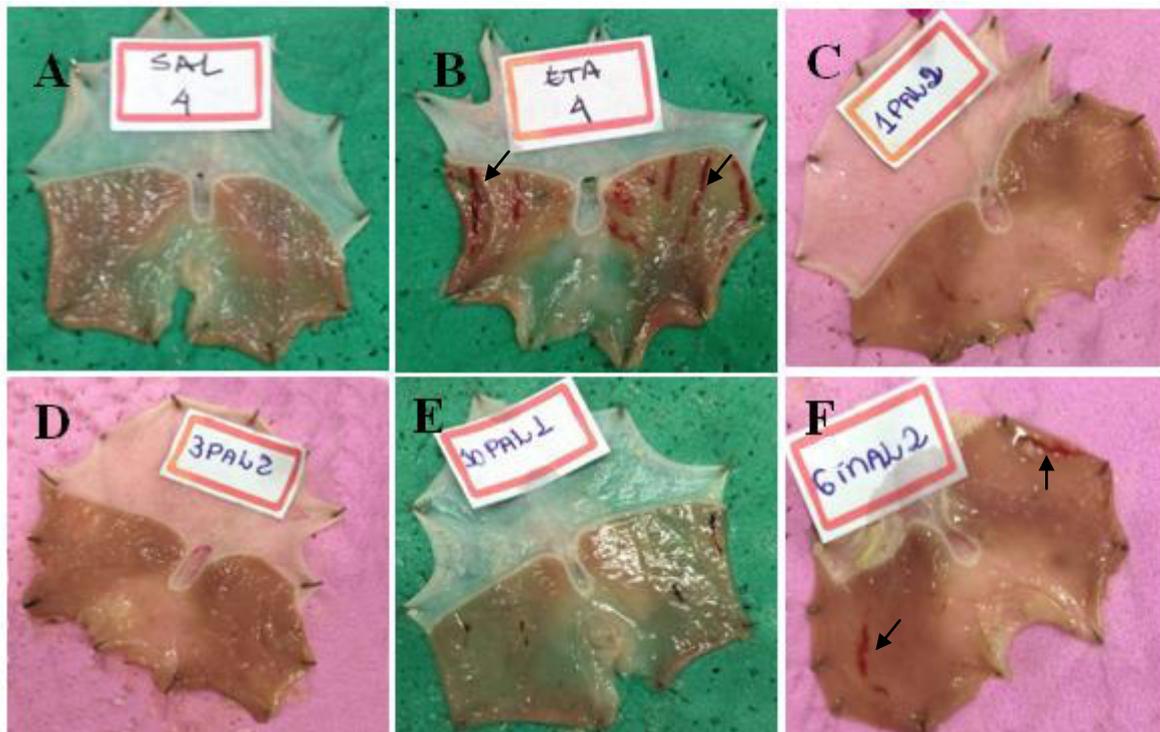
**Figura 12.** Avaliação do efeito protetor do extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e da maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%. A área total das lesões gástricas macroscópicas foi determinada 1 hora após administração do etanol.



O resultado foi expresso como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo salina (controle); (b)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50%. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Fonte: próprio autor.

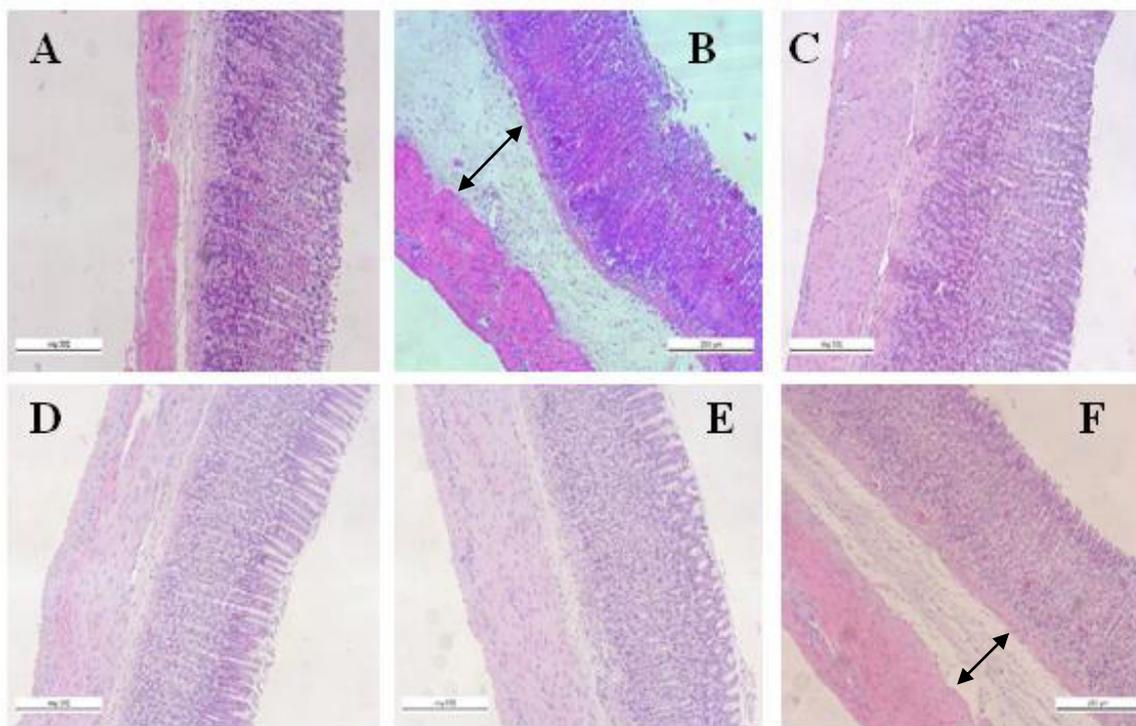
**Figura 13.** Avaliação macroscópica da mucosa gástrica de ratos pré-tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e da maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%.



Fotomicrografias da mucosa gástrica de ratos tratados com: Painei A: grupo salina (0,5 ml/Kg, via oral); Painei B: grupo salina (0,5 mL/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 mL/Kg, via oral); Painei C: grupo palma (1 mg/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 ml/Kg, v.o.); Painei D: grupo palma (3 mg/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 ml/Kg, v.o.); Painei E: grupo palma (10 mg/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 ml/Kg, v.o.); Painei F: grupo maltodextrina (6 mg/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 ml/Kg, v.o.).

Fonte: próprio autor.

**Figura 14.** Fotomicroscopia da mucosa gástrica de ratos pré-tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e da maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%.



Fotomicroscopia da mucosa gástrica de ratos tratados com: Painel A: grupo salina (0,5 ml/Kg, via oral); Painel B: grupo salina (0,5 mL/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 mL/Kg, via oral); Painel C: grupo palma (1 mg/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 ml/Kg, v.o.); Painel D: grupo palma (3 mg/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 ml/Kg, v.o.); Painel E: grupo palma (10 mg/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 ml/Kg, v.o.); Painel F: grupo maltodextrina (6 mg/Kg, v.o.) + etanol 50% (0,5 ml/Kg, v.o.).

Fonte: próprio autor.

**Tabela 11.** Avaliação microscópica pelos critérios de Laine (1988) de ratos pré-tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%.

<b>Grupo Experimental (N=5)</b>	<b>Lesão hemorrágica (escore 0-4)</b>	<b>Edema (escore 0-4)</b>	<b>Perda de arquitetura das células (escore 0-3)</b>	<b>Infiltrado de células (0-3)</b>	<b>Total (escores 17)</b>
<b>Salina (Controle)</b>	0	0	0	0	0
<b>Etanol 50%</b>	3(2-4) <sup>A</sup>	3(2-4) <sup>A</sup>	3(2-3) <sup>A</sup>	2(1-3) <sup>A</sup>	11(7-14) <sup>A</sup>
<b>Palma 1 mg/Kg + Etanol 50%</b>	1(0-1) <sup>B</sup>	0(0-1) <sup>B</sup>	1(1-2) <sup>B</sup>	1(0-1) <sup>B</sup>	3(1-5) <sup>B</sup>
<b>Palma 3 mg/Kg + Etanol 50%</b>	1(1-2) <sup>B</sup>	1(0-2) <sup>B</sup>	2(1-3) <sup>B</sup>	2(1-2) <sup>A</sup>	6(3-9) <sup>B</sup>
<b>Palma 10 mg/Kg + Etanol 50%</b>	1(0-1) <sup>B</sup>	1(1-1) <sup>B</sup>	1(1-2) <sup>B</sup>	1(0-2) <sup>B</sup>	4(2-6) <sup>B</sup>

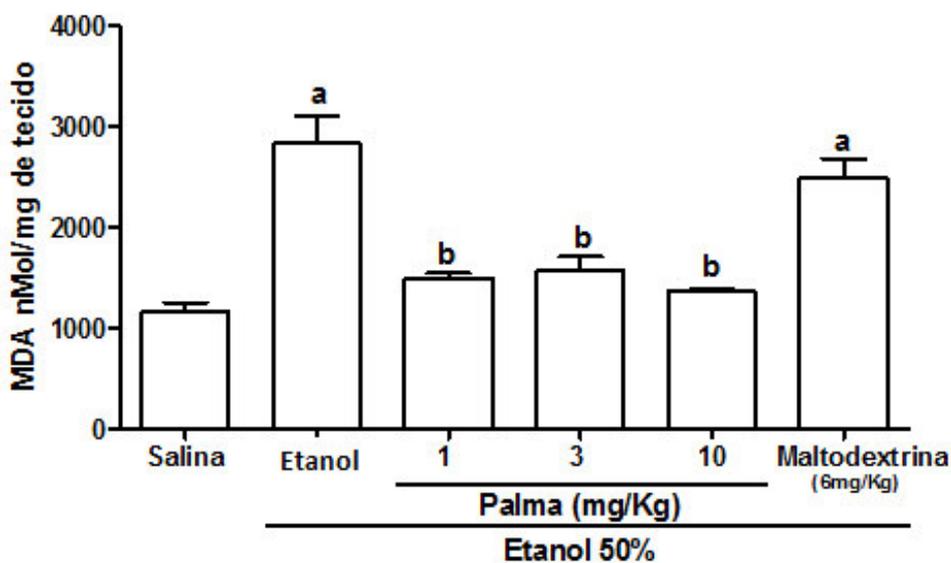
Valores denotam mediana com mínimo e máximo, respectivamente. Teste de Kruskal- Wallis.

(a)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo controle;

(b)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50%.

Fonte: próprio autor.

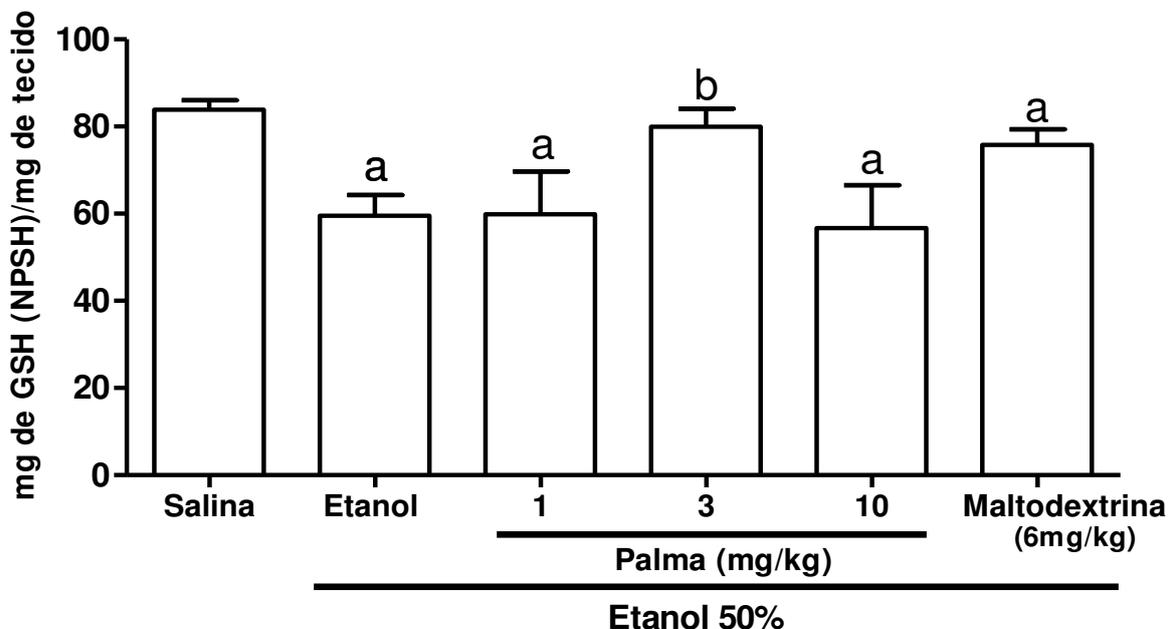
**Figura 15.** Determinação dos níveis de malondialdeído (MDA) na mucosa gástrica de ratos previamente tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e com maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal, no modelo de lesão gástrica induzida.



O resultado foi expresso como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo salina (controle); (b)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50%. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Fonte: próprio autor.

**Figura 16.** Determinação dos níveis dos grupos sulfidrílicos não proteicos (glutathiona – GSH) na mucosa gástrica de ratos previamente tratados com extrato de palma forrageira, nas concentrações de 1, 3 e 10 mg/Kg e com maltodextrina 6 mg/Kg de peso corporal no modelo de lesão gástrica induzida por etanol 50%.



O resultado foi expresso como média  $\pm$  S.E.M. para grupo de seis animais por grupo. (a)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo salina (controle); (b)  $p < 0,05$ , quando comparado com o grupo etanol 50%. A análise estatística foi realizada utilizando ANOVA, seguido do teste de Bonferroni.

Fonte: próprio autor.

## 8. Conclusão

Os testes de rendimento (base úmida) para a obtenção do extrato de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) liofilizado foram realizados com êxito neste estudo, uma vez que são muito superiores aos encontrados na literatura, ressaltando a importância do congelamento prévio dos cladódios a -18 °C por tempo indeterminado e a realização de uma segunda extração, que contribuíram com um aumento médio de 30% no rendimento final total.

O extrato da palma forrageira mostra-se rico em compostos fenólicos, como os flavonoides, aminoácidos e ácidos orgânicos, além da presença de carboidratos.

Os resultados apontam para um produto nutritivo e com capacidade antioxidante advinda da presença de enzimas antioxidantes (catalase e dismutase do superóxido) e dos compostos fenólicos identificados, como os flavonóides quercetina, rutina e isorhamnentina.

O processo de secagem por liofilização, utilizando como adjuvante de secagem a maltodextrina, tornou possível à obtenção do extrato de palma encapsulado.

A análise de citotoxicidade *in vitro* do extrato da palma demonstra que o mesmo não apresenta efeito tóxico as células (cultura IEC-6), o que indica segurança para futuras pesquisas com seres humanos.

Conclui-se então, que o pré-tratamento com extrato de palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) apresenta efeito antioxidante no modelo experimental de lesão gástrica induzida por etanol 50%, por do aumento dos níveis de GSH e da redução dos níveis de MDA e, que a melhor dose testada para realização de futuras pesquisas é a de 3 mg/Kg de peso corporal de ratos Wistar.

## REFERÊNCIAS

- AGNESE, A. M.; PÉREZ, C.; CABRERA, J.L. *Adesmia aegiceras*: Antimicrobial activity and chemical study. **Phytomedicine**. v. 8, p. 389–394, 2001.
- ALAKOLANGA, A. G. A. W.; KUMAR1, N. S.; JAYASINGHE1, L; FUJIMOTO, Y. Antioxidant property and  $\alpha$ -glucosidase,  $\alpha$ -amylase and lipase inhibiting activities of *Flacourtia inermis* fruits: characterization of malic acid as an inhibitor of the enzymes. **Journal of Food Science and Technology**. p. 1-6, 2015.
- ALIMI, H., HFAIEDHA, N., BOUONIA, Z., HFAIEDHA, M., SAKLYB, M., ZOURGUIA, L., RHOUMAB, K. B. Antioxidant and antiulcerogenic activities of *Opuntia ficus-indica* f. *inermis* root extract in rats. **Phytomedicine**, Tunisia, v.17, p. 1120–1126, 2010.
- ARAÚJO, É. J. F.; OLIVEIRA, G. A. L. O.; SOUSA, L.Q., *et al.* Counteracting effects on free radicals and histological alterations induced by a fraction with casearins. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 87, p. 1791-1807, 2015.
- ARUOMA, O. I. Functional nutraceuticals. **Toxicology**, v. 278, p. 2–5, 2010.
- AYOUB, T.E.M.; HADY, S.A.A.; OMRANB, H.T.; SAMAHYB, S. K.; KROHA, L.W.; ROHNC, S. Influence of cultivar and origin on the flavonol profile of fruits and cladodes from cactus *Opuntia ficus-indica*. **Food Research International**. v. 64, p. 864–872, 2014.
- AZEREDO, H. M. C. **Fundamentos de estabilidade de alimentos**. 2. ed. Brasília, DF: Embrapa, 2012. 326 p.
- BAO, M.; LOU, Y. Isorhamnetin prevent endothelial cell injuries from oxidized LDL via activation of p38MAPK. **European journal of pharmacology**, v. 547, p. 22-30, 2006
- BARBOSA, L. F.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO O. Danos oxidativos e neurodegeneração: o que aprendemos com animais transgênicos e nocautes? **Química Nova**. v. 29; p. 1352-1360, 2006.
- BEAUCHAMP, C.; FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. **Analytical Biochemistry**, v. 44, n. 1, p. 276-287, 1971.
- BEECHER, G.R. Nutrient content of tomatoes and tomato products. **Proceedings of The Society for Experimental Biology and Medicine**. v. 218, p. 98–100, 1998.
- BEERS JR, R.F.; SIZER, I.W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase. **Journal of Biological Chemistry**. v. 195, p. 133-140, 1952.
- BORRELLI, F, IZZO A. A. The plant kingdom as a source of anti-ulcer remedies. **Phytotherapy Research**, Italy, v.14, p. 581-591, 2000.
- BOUBAKER, J.; BHOURI, W.; BEN SGHAIER, M.; GHEDIRA, K.; DIJOUX FRANKA, M.G.; GHEKIR-GHEDIRA, L. Ethyl acetate extract and its major constituent, isorhamnetin 3-O-rutinoside, from *Nitraria retusa* leaves, promote apoptosis of human myelogenous erythroleukaemia cells. **Cell Proliferation**. v. 44, p. 453–461. 2011.

BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**. v. 722, p. 248-254, 1976.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem Brasília, 1999b.

BUCCIARELLI, A.; MINETTI, A.; MILCZAKOWSKY, C.; SKLIAR. Evaluation of Gastroprotective activity and acute toxicity of *Solidago chilensis* Meyen (Asteraceae). **Pharmaceutical Biology**, v. 48, p. 1025-1030, 2010.

CALAM, J.; BARON, J.H. Pathophysiology of duodenal and gastric ulcer and gastric cancer. **British Medical Journal**. v.323, p.980-983, 2001.

CARLOS, L. A.; RESENDE, J. V.; CAL-VIDAL, J. Redução da higroscopicidade de pós liofilizados pela indução da cristalização em soluções-modelo de açúcares constituintes de frutas. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.8, n.2, p.163- 173, 2005.

CASA, C.; VILLEGAS, I.; LASTRA, C. A.; MOTILVA, V.; CALERO, M. J. M. Evidence for protective and antioxidant properties of rutin, a natural flavone, against ethanol induced gastric lesions. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 71, p. 45–53, 2000.

CEBALLOS, A. M.; GIRALDO, G. I.; ORREGO, C. E. Effect of freezing rate on quality parameters of freeze dried soursop fruit pulp. **Journal of Food Engineering**. v. 111, p. 360 – 365, 2012.

CHAVES, M. C. V.; GOUVEIA, J. P. G.; ALMEIDA, F. A. C.; LEITE, J. C. A.; SILVA, F. L. H. Caracterização físico-química do suco da acerola. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**. Paraíba, v. 4, n. 2, 2004.

CHE MAN, Y. B.; IRWANDI, J.; ABDULLAH, W. J. W. Effect of different types of maltodextrin and drying methods on physico-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavour. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1075-1080, 1999.

CHOUGUI, N.; DJERROUD, N.; NARAOU, F.; HADJAL, S.; ALIANE, K.; ZEROUAI, B.; LARBAT, R. Physicochemical properties and storage stability of margarine containing *Opuntia ficus-indica* peel extract as antioxidant. **Food Chemistry**, v. 173, p. 382-390, 2015.

CNUBBEN, N. H. P.; RIETJENS, I.M.C.M.; WORTELBOER, H.; ZANDEN, J. V.; BLADEREN, P. J. V. The interplay of glutathione-related processes in antioxidant defense. **Environmental Toxicology and Pharmacology**. v. 10, p. 141–152, 2001.

COCK, L. S.; MUÑOZ, D. P. V.; APONTE, A. A. Structural, physical, functional and nutraceutical changes of freeze-dried fruit. **African Journal of Biotechnology**, v. 14, p. 442-450, 2015.

DÍAZ, E. M., PAZ O. J., TELLEZ M. M. A., SANTILLÁN, C., CÁNOVAS B. G., FLORES Z. P. B., OLIVAS, G. I. Development and Characterization of Edible Films Based on Mucilage of *Opuntia ficus-indica* (L.). **Journal of Food Science**, v. 75, n. 6, p. 347-352, 2010.

DODDA, D.; CHHAJED, R.; MISHRA, J. Protective effect of quercetin against acetic acid induced inflammatory bowel disease (IBD) like symptoms in rats: Possible morphological and biochemical alterations. **Pharmacological Reports**. v. 66, p.169–173, 2014.

DONATINI, R. S., ISHIKWA, T., BARROS, S. B. M., BACCHI, E. M. Atividades antiúlcera e antioxidante do extrato de folhas de *Syzygium jambos* (L.) Alston (Myrtaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 1A, p. 89-94, jan./mar. 2009.

DUBEUX JR, J. C. B., SANTOS, M. V. F., CAVALCANTE, M., SANTOS, D. C. Potencial da palma forrageira na América do Sul. **Cactusnet**, 2012. p. 29.

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

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

GALATI, E.M., PERGOLIZZI, S., MICELI, N., MONFORTE, M.T. Y TRIPODO, M.M. Study on the increment of the production of gastric mucus in rats treated with *Opuntia ficus-indica* (L.) Mill. Cladodes. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 83, n.3, p. 229-233, 2002.

GALLEANO, M.; PUNTARULO, S. Role of antioxidants on the erythrocytes resistance to lipid peroxidation after acute iron overload in rats. **Biochim Biophys Acta**, v. 1271, p. 321-326, 1995. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7605798>>.

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

GAVA, A. J.; SILVA, C.A. B.; FRIAS, J. R. G. Tecnologia de Alimentos. **NBL Editora**. p. 511, 2009.

GERMANO, P. M. L., GERMANO, M. I. S. Higiene e vigilância sanitária de alimentos: qualidade das matérias-primas, doenças transmitidas por alimentos, treinamento de recursos humanos. 4. ed. Barueri: **Manole**, 2011.1034 p.

GIANNOPOLITIS, C.N.; RIES, S.K. Superoxide dismutase. I. Occurrence in higher plants. **Plant Physiology**. v. 59, p. 309-314, 1977.

GOMES, A. S. Efeito protetor da via hemeoxigenase 1/ biliverdina/ co em Modelos de lesões gástricas em camundongos – papel da Guanilato ciclase solúvel (gcs) e da no sintase (nos). **Tese (Doutorado em Farmacologia)** – Universidade Federal do Ceará, Fortaleza-Ce, 2009.

GONZAGA, M. L. C., RICARDO, N. M. P. S., HEATLEY, F., & SOARES, S. A. Isolation and characterization of polysaccharides from *Agaricus blazei* Murill. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n.1, p. 43–49, 2005.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Effect of Maltodextrin Addition during Spray Drying of Tomato Pulp in Dehumidified Air: II. Powder Properties. **Drying Technology**, v. 26, n.6, p. 726-737, 2008.

HALLER, C. A. Nutraceuticals: Has there been any progress? **Clinical Pharmacology; Therapeutics** v. 87, n. 2, p. 137-141, 2010.

HAMILTON, W. J. **Tratado de anatomia humana**. 2a ed. Rio de Janeiro: Interamericana, 1982.

HOU, Y.; YIN, Y.; WU, G. Dietary essentiality of “nutritionally non-essential amino acids” for animals and humans. **Experimental Biology and Medicine**. v. 240, p. 997–1007, 2015.

ITO, H.; MIYAKE, M.; NISHITANI, E.; MORI, K.; HATANO, T.; OKUDA, T., et al. Anti-tumor promoting activity of polyphenols from *Cowania mexicana* and *Coleogyne ramosissima*. **Cancer Letters**. v, 143, p. 5–13, 1999.

JIANG, X.; WEST, A.A.; CAUDILL, M.A. Maternal choline supplementation: A nutritional approach for improving offspring health? **Trends in Endocrinology and Metabolism**. v. 25, p.263–273, 2014.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. **Histologia Básica**. 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

KASHYAP, M. K.; YADAV, V.; SHERAWAT, B. S.; JAIN, S.; KUMARI, S.; KHULLAR, M.; *et al.* Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**. v. 277; p. 89-99, 2005.

KIM, J.H.; LEE, H.; PARK, Y.; RA, K.S.; SHIN, K.; YU, K., ET AL. Mucilage removal from cactus cladodes (*Opuntia humifusa* Raf.) by enzymatic treatment to improve extraction efficiency and radical scavenging activity. **Food Science and Technology**. v. 51, p. 337–342, 2013.

KO, S. K., CHO, C. H. Histological study of mechanisms of adaptive cytoprotection on ethanol-induced mucosal damage in rat stomachs. **Digestive Diseases and Science**, v. 43, n.6, p. 1248-57, 1998.

KOEPPEN, B. M.; STATON, B. A. Berne & Levy – **Fisiologia**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

LAINE, L.; WEINSTEIN, W. M. Histology of alcoholic hemorrhagic "gastritis": a prospective evaluation. **Gastroenterology**, v. 94, n. 6, p. 1254-62, 1988.

- LAINE, P.; KYLLI, P.; HEINONEN, M.; JOUPPILA, K. Storage Stability of Microencapsulated Cloudberry (*Rubus chamaemorus*) Phenolics. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 56, p. 11251–11261, 2008.
- LEYTON, M.; YOUNG, S.N.; PIHL, R.O.; ETEZADI, S.; LAUZE, C.; BLIER, P.; BAKER, G.B.; BENKELFAT, C. Effects on Mood of Acute Phenylalanine/Tyrosine Depletion in Healthy Women. *Neuropsychopharmacology*. v. 22, p. 52–63, 2000.
- LIMA, H. C. A.; CALVO, T. R.; RODRIGUES, C. M.; ANDRADE, F. D. P.; VILEGAS, W.; BRITO, A. R. M. S. Antiulcerogenic activity of *Alchornea castaneaefolia*: Effects on somatostatin, gastrin and prostaglandin. *Journal Ethnopharmacol.* v. 104, p. 215-224, 2006.
- LOPERA, S. M. C.; GUZMÁN, C. O.; CATAÑO, C. R.; GALLARDO, C. C. Desarrollo y caracterización de Micropartículas de ácido fólico formadas por Secado por aspersión, utilizando goma arábica y Maltodextrina como materiales de pared. *Revista de la Facultad de Química Farmacéutica*, Medellín, Colombia, v. 16, p. 55-65, 2009.
- MACIEJ, J.; SCHÄFF, C.T.; KANITZ, E.; TUCHSCHERER, A.; BRUCKMAIER, R.M.; WOLFFRAM, S.; HAMMON, H.M. Bioavailability of the flavonol quercetin in neonatal calves after oral administration of quercetin aglycone or rutin. *Journal of Dairy Science*. v. 98, p. 3906–3917, 2015.
- MARQUES, L. F. Liofilização de Frutas Tropicais. **Tese (Doutorado em Engenharia Química)** – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos-SP, 2008.
- MARTINS, S. C. C. Avaliação do potencial biológico de *Opuntia ficus-indica* (Figueira da Índia). **Dissertação (mestrado em Ciências Farmacêuticas)**. Universidade Fernando Pessoa, Faculdade de Ciências da Saúde, Porto, 2011.
- MARUF, A. A.; LIP, H.; WONG, H.; BRIEN, O. P. J. Protective effects of ferulic acid and related polyphenols against glyoxal- or methylglyoxal-induced cytotoxicity and oxidative stress in isolated rat hepatocytes. *Chemico-Biological Interactions*. v. 234, p; 96-104, 2015.
- MEISTER, A. Glutathione deficiency produced by inhibition of its synthesis, and its reversal; Applications in research and therapy. *Pharmacology & Therapeutics*. v. 51. p. 155-194, 1991.
- MENEZES, A.R. V.; SILVA JUNIOR, A.; CRUZ, H.L.L.; ARAÚJO, D.R.; SAMPAIO, D.D. Estudo comparativo do pó da acerola verde obtido em estufa por circulação de ar e por liofilização. *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, Campina Grande, v.11, p.1-8, 2009.
- MIHARA, M., UCHIYAMA, M. Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, v. 86, p. 271-278, 1978.
- MIZUI, T.; DOTEUCHI, M. Lipid peroxidation: a possible role in gastric damage induced by ethanol in rats. *Life sciences*, v. 38, p. 2163-2167, 1986.
- MØLLER, I.M.; JENSEN, P.E. & HANSSON, A. Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. v.58; p. 459-481, 2007.

- MOSMANN, TIM. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v.65, p. 55–63, 1983.
- NAFEES, S.; RASHID, S.; ALI, N.; HASAN, S. K.; SULTANA, S. Rutin ameliorates cyclophosphamide induced oxidative stress and inflammation in Wistar rats: Role of NF $\kappa$ B/MAPK pathway. **Chemico-Biological Interactions**. v. 231, p. 98–107, 2015.
- NAVA, A. A.; OLIVER, M. C.; CAMPOS, O. N. M.; ZOU, T.; GU, L.; TORRES, N.; TOVAR, A. R.; CHAVERRI, J. P. Extract of cactus (*Opuntia ficus indica*) cladodes scavenges reactive oxygen species in vitro and enhances plasma antioxidant capacity in humans. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 13-24, 2014.
- NUNES, C. S. Usos E Aplicações da Palma Forrageira como Uma Grande Fonte de Economia para o Semiárido Nordeste. **Revista Verde**, Mossoró, v. 6, p. 58–66, 2011.
- OLIVEIRA A. S. C.; FILHO F. N. C.; RANGEL A. H. N.; LOPES K. B. P. A palma forrageira: alternativa para o semiárido. **Revista Verde** (Mossoró – RN – Brasil). v.6, p. 49-58, 2011a.
- OLIVEIRA, D. M.; CLEMENTE, E.; COSTA, J. M. C. Hygroscopic behavior and degree of *caking* of grugru palm (*Acrocomia aculeata*) powder. **Journal of Food Science and Technology**, v.51, p.2783-2789, 2012.
- OLIVEIRA, E. N. A., SANTOS, D. C., SOUSA, F. C., MARTINS, J. N., OLIVEIRA, S. P. A. Obtenção de ubaia desidratada pelo processo de liofilização. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 04, p. 235-242, 2010.
- OLIVEIRA, G. S., COSTA, J. M. C., AFONSO, M. R. A. Caracterização e comportamento higroscópico do pó da polpa de cajá liofilizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, p.1059–1064, 2014.
- OLIVEIRA, L. S. Avaliação do metabolismo antioxidante durante o desenvolvimento de frutos de clones de aceroleira e sapotizeiro. **Tese (Doutorado em Bioquímica)** – Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, CE, 2012.
- OLIVEIRA, L.S.; RUFINO, M.S.M.; MOURA, C.F.H.; CAVALCANTI, F.R.; ALVES, R.E.; MIRANDA, M.R.A. The influence of processing and long-term storage on the antioxidant metabolism of acerola (*Malpighia emarginata* D.C) purée. **Brazilian Journal of Plant Physiology**. v. 23, p. 151-160, 2011b.
- OMS – ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE – Global status report on alcohol and health. **WHO Press**; Geneva, Switzerland: 2011.
- PEDRO, M. A. M. Influência de encapsulantes e do método de secagem nas Propriedades físico-químicas e atributos de qualidade de polpa de maracujá (*passiflora edulis f. Flavicarpa*) em pó. **Tese (Doutorado em Engenharia e Ciência de Alimentos)** – Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Sao Jose do Rio Preto–SP, 2009.
- PORTH, C. M; KUNERT, M. P. **Fisiopatologia**. 6 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2004.

- RAMÍREZ, V. R., MARTÍNEZ, O. M. Y., MUÑOZ, H. R. Reversing gastric mucosal alterations during ethenol-induced chronic gastritis in rats by oral administration of *Opuntia ficus-indica* mucilage. **World Journal Gastroenterol**, China, v. 12, p. 4318-4324, 2006.
- RANG, H. P; DALE, M. M; RITTER, J. M; MOORE, P. K. **Farmacologia**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora. Tradução da 5 ed. americana, 2004.
- REED, T. T. Lipid peroxidation and neurodegenerative disease. **Free Radical Biology and Medicine**. v. 51, p. 1302-1319, 2011.
- REINOLDS, S. G.; ARIAS, E. **General background on Opuntia**. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/005/y2808e/y2808e04.htm>>. Acesso em: 27 nov. 2014.
- RIO, D. D.; STEWART, A.J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**. v. 15, p. 316–328, 2005.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, p. 105-110, 2002.
- ROSS, D. Glutathione, free radicals and chemotherapeutic agents: Mechanisms of free-radical induced toxicity and glutathione-dependent protection. **Pharmacology & Therapeutics**. v. 37. p. 231–249, 1988.
- RUFINO, M.S.M.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S.; MORAIS, S.M.; SAMPAIO, C.G.; PÉREZJIMENEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.D. **Metodologia Científica: Determinação da atividade antioxidante total em frutas pela captura do radical livre ABTS.+**. Embrapa Agroindústria Tropical, 2006. 4 p. (Embrapa Agroindústria Tropical. Comunicado Técnico, 128).
- SÁENZ, C.; SEPÚLVEDA, E.; MATSUHIRO, B. *Opuntia* spp mucilage's: a functional component with industrial perspectives. **Journal of Arid Environments**, v.57, p. 275–290, 2004.
- SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**, v. 114, p. 616-622, 2009.
- SCHNEIDER, A. C. R. Alterações hepáticas causadas pelo etanol e efeito do tratamento com lactobacillus rhamnosus GG em zebrafish (*Danio rerio*). **Tese (Doutorado em Ciências em Gastroenterologia e Hepatologia)**. Universidade Federal do Rio Grande do Sul, FAMED. Porto Alegre, RS, 2015.
- Scientific opinion on the safety and efficacy of malic acid and a mixture of sodium and calcium malate when used as technological additives for all animal species. **European Food Safety Authority**. v. 2, p. 3563–3580, 2014.
- SEDLAK J, LINDSAY RH. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**. v. 25, p. 192-205, 1968.
- SON, J. E.; LEE, B. H.; NAM, T. G.; IM, S.; CHUNG, D. K.; LEE, J. M.; CHUN, O. K.; KIM, D. O. Flavonols from the Ripe Fruits of *Opuntia ficus-indica* Var. *saboten* Protect

Neuronal PC-12 Cells against Oxidative Stress. **Journal of Food Biochemistry**. v. 38, p.518–526, 2014.

SOBRATTEE, M.A.; NEERGHEEN, V.S.; LUXIMON-RAMMA, A.; ARUOMA, O.I.; BAHORUN, T. Phenolics as potential antioxidant therapeutic agents: mechanisms and actions. **Mutation Research**. v. 579, p. 200–213, 2005.

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

SUNG, J. J. Y.; KUIPERS, E. J.; EL-SERAG, H. B. Systematic review: the global incidence and prevalence of peptic ulcer disease. **Alimentary pharmacology & therapeutics**. v. 29, p. 938-946, 2009.

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

TWEDT, D. C; MAGNE, M. L. Moléstia do estômago. In: ETTINGER, J. S. **Tratado de Medicina Interna Veterinária**, 3.ed. São Paulo: Manole, p.1353-1386, 1992.

VASCONCELOS, S. M. L. *et al.* Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**. v. 30, p.1323-1338, 2007.

VILLAÇA, Y. A.; FILGUEIRAS, C. C.; MANHÃES, A. C. Developmental aspects of the cholinergic system. **Behavioural Brain Research**. v. 221, p. 367–378, 2011.

WALLACE, J. L. Prostaglandins, NSAIDs, and gastric mucosal protection: why doesn't the stomach digest itself? **Physiol Rev**. v. 88, p. 1547 – 1565, 2008.

Watanabe, M.; Maemura, K.; Kanbara, K.; Tamayama, T.; Hayasaki, H. GABA Receptors in the Central Nervous System and Other Organs. **International Review of Cytology**. v. 213, p. 1-47, 2002.

WILSON, K.; WALKER, J. Principles and Techniques of Biochemistry and Molecular Biology. **Cambridge University Press**, 7.ed. p. 352, 2010.

WU, G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition. **Amino Acids**. v. 37, p. 1-17, 2009.

ZEISEL, S. H.; CAUDILL, M. A. CHOLINE. **American Society for Nutrition. Advances in Nutritions**. v. 1, p. 46–48, 2010.

ZHANG, N.; PEI, F.; WEI, H.; ZHANG, T.; YANG, C.; MA, G., et al. Isorhamnetin protects rat ventricular myocytes from ischemia and reperfusion injury. **Experimental and Toxicologic Pathology**. v. 63, p. 33, 2011.

ZHONG, X.-K, JIN, X., LAI, F.-Y., LIN, Q.-S, JIANG, J.-G. Chemical analysis and antioxidant activities in vitro of polysaccharide extracted from *Opuntia ficus indica* Mill. cultivated in China. **Carbohydrate Polymers**, v. 82, p.722–727, 2010.

ZOURGUI, L., GOLLI, E. E., BOUAZIZ, C. BACHA, H., HASSEN, W. Cactus (*Opuntia ficus-indica*) cladodes prevent oxidative damage induced by the mycotoxin zearalenone in Balb/C mice. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p. 1817–1824, 2008.