



**UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-  
BRASILEIRA**

**INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL  
MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E TECNONOLOGIAS  
SUSTENTÁVEIS**

**ETHO ROBERIO MEDEIROS NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NUTRICIONAL DE *PERESKIA ACULEATA*  
MILLER E SEUS ASPECTOS NUTRITIVOS EM UMA DIETA CRÔNICA DE  
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR PROTEICA PARA CAMUNDONGOS**

**REDENÇÃO**

**2016**



UNIVERSIDADE DA INTEGRAÇÃO INTERNACIONAL DA LUSOFONIA AFRO-  
BRASILEIRA  
INSTITUTO DE ENGENHARIAS E DESENVOLVIMENTO SUSTENTÁVEL  
MESTRADO ACADÊMICO EM SOCIOBIODIVERSIDADE E TECNONOLOGIAS  
SUSTENTÁVEIS

ETHO ROBERIO MEDEIROS NASCIMENTO

AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NUTRICIONAL DE *PERESKIA ACULEATA* MILLER E  
SEUS ASPECTOS NUTRITIVOS EM UMA DIETA CRÔNICA DE SUPLEMENTAÇÃO  
ALIMENTAR PROTEICA PARA CAMUNDONGOS

REDENÇÃO

2016

**Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro- Brasileira  
Direção de Sistema Integrado de Bibliotecas da UNILAB (DSIBIUNI)  
Biblioteca Setorial Campus Liberdade  
Catalogação na fonte**

**Bibliotecário: Gleydson Rodrigues Santos – CRB-3 / 1219**

---

N193a Nascimento, Etho Roberio Medeiros.

Avaliação da segurança nutricional de Pereskia Aculeata Miller e seus aspectos nutritivos em uma dieta crônica de suplementação alimentar proteica para camundongos. / Etho Roberio Medeiros Nascimento. – Redenção, 2016.

124 f.; 30 cm.

Dissertação apresentada ao curso de Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis - MASTS da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira – UNILAB.

Orientadora: Profa. Dra. Juliana Jales de Hollanda Celestino.

Inclui figuras, gráficos, referências e tabelas.

1. 1. Segurança alimentar - Brasil. I. Título.

CDD 363.80981

---

**ETHO ROBERIO MEDEIROS NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NUTRICIONAL DE *PERESKIA ACULEATA*  
MILLER E SEUS ASPECTOS NUTRITIVOS EM UMA DIETA CRÔNICA DE  
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR PROTEICA PARA CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Área de Concentração: Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis

Linha de Pesquisa: Tecnologias e Desenvolvimento Sustentável

Orientadora: Prof. Dra. Juliana Jales de Hollanda Celestino

Coorientador: Prof. Dr. Daniel Freire de Sousa

REDENÇÃO

2016

**ETHO ROBERIO MEDEIROS NASCIMENTO**

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA NUTRICIONAL DE *PERESKIA ACULEATA*  
MILLER E SEUS ASPECTOS NUTRITIVOS EM UMA DIETA CRÔNICA DE  
SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR PROTEICA PARA CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis da Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira, como requisito para a obtenção do título de mestre

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Juliana Jales de Hollanda Celestino (Orientadora)  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Caroline Rocha de Melo Leite  
Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB)

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniele de Oliveira Bezerra Sousa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as bênçãos e realizações concedidas a mim.

Aos meus familiares (Socorro, Neide, Jakson, Gerardo Duarte) pelo apoio, incentivo, confiança, amizade e dedicação a minha formação pessoal e acadêmica.

Ao meu primo Robert Medeiros Fonteles, que infelizmente nos deixou recentemente, mas que tenho a plena certeza de que se encontra repousando em paz e com a graça de Deus.

À minha mãe (Juraci Medeiros Nascimento) pelo amor, dedicação, confiança e superação de todas as dificuldades e obstáculos enfrentados para me proporcionar uma educação de qualidade.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Juliana Jales de Hollanda Celestino, orientadora, pelo incentivo, apoio, aprendizado, amizade e colaboração. Parabenizo-a pelo imenso amor, competência e dedicação, destinado a docência na Universidade Federal da Lusofonia Afro-Brasileira (UNILAB), especialmente no Mestrado Acadêmico em Sociobiodiversidade e Tecnologias Sustentáveis (MASTS). Agradeço-a por vários motivos, mas, em especial, pela amizade e companheirismo cultivados durante esse tempo. As suas orientações foram fundamentais para a minha formação profissional, social e humana. Gratidão Professora Juliana!

Ao Prof. Dr. Daniel Freire de Sousa pela paciência, amizade, ensinamentos e por toda ajuda nos momentos mais difíceis e de incerteza, principalmente relacionados à pesquisa.

Ao Prof. Dr. Said Gonçalves da Cruz Fonseca pela atenção, paciência e disponibilidade, principalmente pelo conhecimento transmitido para o desenvolvimento da pesquisa. Sem dúvidas um exemplo de pessoa e de profissional.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Daniele de Oliveira Bezerra de Sousa pelas contribuições sempre precisas e pertinentes acerca do estudo.

À Prof<sup>ª</sup>. Dra. Maria Goretti Rodrigues de Queiroz pela oportunidade e disponibilidade de realização da pesquisa no Laboratório de Pesquisa de Bioquímica Clínica. A sua contribuição foi imprescindível.

Ao Prof. Dr. José Ricardo de Figueiredo por também conceder o espaço e subsídios necessários para o desenvolvimento das etapas da pesquisa.

Aos meus amigos da 1<sup>o</sup> turma de mestrado da UNILAB Alzeir, Mauro, André, Héliida, Adriana, Paula, Mel e Dani. Tenho muito orgulho de ter cultivado amizades verdadeiras que irei levar para a vida. Sem dúvidas vocês são as melhores pessoas com quem poderia dividir esse momento e compartilhar esse tempo.

Aos meus amigos e companheiros de jornada acadêmica e de orientação, Aline e Amiry. Apesar de todas as brincadeiras sobre doutrinação e hierarquia acadêmica, gostaria de vos agradecer de coração. O êxito desse trabalho é todo mérito de vocês que se sacrificaram e contribuíram bastante em todos os momentos.

Aos amigos conquistados no Laboratório de Pesquisa de Bioquímica Clínica, Richard, Mariana, Priscilla e Alysson. As vossas contribuições foram de suma importância. Agradeço também pelo acolhimento e ambiente familiar que encontrei junto a vocês.

Aos também amigos conquistados no Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais (LAMOFOPA), Ritinha, Laritza, Nathalie, Gildas, Denise, Naiza, Luana e Deysi, pelo acolhimento, amizade e disponibilidade.

Ao meu caro colega Glautembegue, pela contribuição na realização das análises realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas (LACT).

À Universidade da Integração Internacional da Lusofonia Afro-brasileira (UNILAB) e todo o seu quadro de professores e funcionários, em especial aos membros do MASTS, pela dedicação e ensinamentos.

À Universidade Federal do Ceará (UFC) e a Universidade Estadual do Ceará (UECE) e todo o seu corpo de docentes e funcionários por terem contribuído com o meu crescimento.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo seu incentivo constante ao desenvolvimento acadêmico e a pesquisa.

## RESUMO

Diante da grande biodiversidade brasileira, surge a perspectiva de aproveitamento de algumas espécies para fins alimentícios, com destaque para as hortaliças não-convencionais, por possuírem grande quantidade de nutrientes. Devido ao seu alto teor de nutrientes, a *Pereskia aculeata* Miller (*P. aculeata*) destaca-se como uma das espécies mais promissoras de grupo. Entretanto, sob a perspectiva de que a ingestão de vegetais pode resultar na intoxicação ou no surgimento de alterações metabólicas, faz-se necessário pesquisar sobre as propriedades tóxicas, antinutricionais e os respectivos efeitos no organismo humano. O objetivo do presente trabalho foi avaliar os possíveis efeitos toxicológicos, antinutricionais e alterações metabólicas em camundongos submetidos a uma suplementação alimentar com farinha de *P. aculeata* na alimentação. Os animais foram submetidos ao teste *Up-and-Down*, ensaios de suplementação crônica por 30 e 90 dias, e a testes para a determinação de fatores antinutricionais. O teste *Up-and-Down* se deu através da estimativa da DL<sub>50</sub> em que foram administradas doses de 175 mg/kg a 5.000 mg/kg de animal, por via oral. Na avaliação da suplementação por 30 e 90 dias, a farinha das folhas de *P. aculeata* foi suplementada na ração convencional de camundongos, nas concentrações de 5%, 10% e 20% de inclusão. A determinação dos fatores antinutricionais se deu através dos ensaios de atividade inibitória de tripsina e determinação da concentração de taninos totais. Nesses protocolos, foram avaliados parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos. Também foram realizadas análises para a determinação bromatológica das folhas de *P. aculeata*. Os dados bioquímicos e hematológicos obtidos, além dos relacionados ao ganho de massa corpórea, ingestão de água e ração, bem como a massa dos órgãos, foram tabulados e plotados nos programas GraphpadPrism 5.0 e Microsoft Office Excel 2013<sup>®</sup> para análise estatística. A DL<sub>50</sub> da *P. aculeata* nesse estudo foi estimada superior a 5000 mg/Kg, além de não apresentar efeitos toxicológicos ou alterações comportamentais nos animais submetidos ao teste. Na análise de suplementação crônica por 30 e 90 dias, os animais apresentaram redução nos teores de glicose, triglicerídeos e colesterol. Entretanto, os mesmos apresentaram valores elevados para AST e ALT, o que pode estar relacionada com as alterações hepáticas observadas nesse estudo. Além disso, os animais apresentaram alterações nos parâmetros hematimétricos, o que aponta indícios de anemia, e lesões histopatológicas no fígado. Além disso, a planta estudada em questão, apresentou baixos teores de inibidores de tripsina (0,114 UI/mg) e taninos taninos (0,40%), na sua composição. Deste modo, observa-se que a *P. aculeata* possui efeitos deletérios a níveis bioquímicos, hematológicos e histopatológicos a

níveis crônicos de suplementação, mais precisamente no nível de inclusão de 20% na ração, mas sem ocasionar efeitos severos ou levar os animais a óbito.

**Palavras-chave:** Segurança alimentar, *Pereskia aculeata* Miller, Efeitos tóxicos e antinutricionais, Suplemento proteico.

## ABSTRACT

Given the broad Brazilian biodiversity arises the harnessing perspective of some species used in food purposes, especially for the non-conventional vegetable crops, since they have large amount of nutrients. Due to its high content of nutrients, *Pereskia aculeata* Miller (*P. aculeata*) stands out as one of the most promising species group. However, from the perspective of the intake of vegetables can lead to the intoxication or the appearance of metabolic changes, it becomes necessary research about the toxic properties, anti-nutritional and their effects on the human body. The objective of this study was to evaluate the possible toxicological effects, anti-nutritional and metabolic alterations in mice subjected to a dietary supplementation with *P. aculeata* flour in food. The animals were subjected to testing *Up-and-Down*, chronic supplementation trials for 30 and 90 days, and tests for the determination of anti-nutritional factors. The up-and-down test occurred through the estimated LD<sub>50</sub> in which doses were administered 175 mg / kg to 5,000 mg / kg animal by the oral route. In the evaluation of supplementation for 30 and 90 days the flour of *P. aculeata* leaves in conventional diet was supplemented mice, in concentrations of 5%, 10% and 20% inclusion. The determination of antinutritional factors occurred through the inhibitory activity of trypsin assays and determination of the total concentration of tannin. In these protocols were evaluated behavioral, biochemical, hematological and histopathological parameters. Also analyzes were performed for the determination of bromatological *P. aculeata* leaves. The biochemical and hematological data, in addition to related to body mass gain, drinking water and food, as well as the mass of bodies, were tabulated and plotted in programs GraphpadPrism 5.0 and Microsoft Office Excel 2013® for statistical analysis. The LD<sub>50</sub> of *P. aculeata* in this study was estimated more than 5000 mg / kg, besides not presenting toxicological effects or behavioral changes in the test animals. In the chronic supplementation analysis 30 to 90 days, the animals showed a reduction in glucose levels, triglycerides and cholesterol. However, they showed high values for AST and ALT, which may be related to the liver abnormalities observed in this study. Additionally, the animals showed changes in hematometric parameters, the pointing indication of anemia, and histopathological lesions in the liver. Moreover, the plant in question studied, showed low levels of trypsin inhibitor (0.114 IU / mg) tannin and tannin (0.40%) in its composition. Thus, it is observed that *P. aculeata* has deleterious effects levels biochemical, hematological and histological levels of the chronic supplementation, more precisely in 20% inclusion levels in the diet, but without causing severe effects or cause animals died.

**Keywords:** Food security, *Pereskia aculeata* Miller, Toxic and anti-nutritional effects, Protein supplementation

## LISTA DE FIGURAS

<b>FIGURA 01</b>	<i>Pereskia aculeata</i> Miller.....	32
<b>FIGURA 02</b>	Modelo da metodologia de Diagnose Foliar.....	47
<b>FIGURA 03</b>	Representação esquemática da escolha da dose para estimativa da DL <sub>50</sub> de <i>P. aculeata</i> através da OECD 425.....	50

## LISTA DE TABELAS

<b>TABELA 01</b>	Concentração de ferro de diferentes alimentos comparados com as folhas de <i>P. aculeata</i> .....	33
<b>TABELA 02</b>	Valores nutricionais das folhas de <i>P. aculeata</i> expressos em Matéria Seca.....	55
<b>TABELA 03</b>	Teor de minerais das folhas de <i>P. aculeata</i> .....	55
<b>TABELA 04</b>	Pesos inicial e final dos camundongos após administração de suspensão de farinha das folhas de <i>P. aculeata</i> via oral, bem como observação e o aparecimento de sinais de toxicidade e mortalidade.....	57
<b>TABELA 05</b>	Achados na análise histopatológica do fígado dos animais submetidos aos tratamentos com diferentes níveis de inclusão da farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> .....	78
<b>TABELA 06</b>	Achados na análise histopatológica dos rins dos animais submetidos aos tratamentos com diferentes níveis de inclusão da farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> .....	78
<b>TABELA 07</b>	Achados na análise histopatológica do coração dos animais submetidos aos tratamentos com diferentes níveis de inclusão da farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> .....	79

## LISTA DE GRÁFICOS

<b>Gráfico 01</b>	Consumo semanal médio de água (mL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	58
<b>Gráfico 02</b>	Consumo semanal médio de ração (g) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	59
<b>Gráfico 03</b>	Ganho de massa corpórea (g) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	59
<b>Gráfico 04</b>	Concentração plasmática de glicose (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	60
<b>Gráfico 05</b>	Concentração plasmática de colesterol (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	61
<b>Gráfico 06</b>	Concentração plasmática de triglicerídeos (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	62
<b>Gráfico 07</b>	Concentração plasmática de ureia (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e	

	ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	63
<b>Gráfico 08</b>	Concentração plasmática de creatinina (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	63
<b>Gráfico 09</b>	Concentração plasmática de globulina (g/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	64
<b>Gráfico 10</b>	Concentração plasmática de proteínas totais (g/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	65
<b>Gráfico 11</b>	Concentração plasmática de albumina (g/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	65
<b>Gráfico 12</b>	Concentração plasmática de AST (U/L) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	66
<b>Gráfico 13</b>	Concentração plasmática de ALT (U/L) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	67

<b>Gráfico 14</b>	Concentração de leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	68
<b>Gráfico 15</b>	Número de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	68
<b>Gráfico 16</b>	Concentração de hemoglobina plasmática (g/dL) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	69
<b>Gráfico 17</b>	Valor de hematócrito (%) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	70
<b>Gráfico 18</b>	Volume corpuscular médio (fL) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	70
<b>Gráfico 19</b>	O teor de hemoglobina corpuscular média (pg) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	71
<b>Gráfico 20</b>	Concentração de hemoglobina corpuscular média (%L) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas	

	inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	72
<b>Gráfico 21</b>	Número de plaquetas ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	72
<b>Gráfico 22</b>	Número de leucócitos totais ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	73
<b>Gráfico 23</b>	Número de neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	74
<b>Gráfico 24</b>	Número de linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	74
<b>Gráfico 25</b>	Massa absoluta do órgão fígado (g) dos camundongos após o tratamento por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	75
<b>Gráfico 26</b>	Massa absoluta do órgão rim (g) dos camundongos após o tratamento por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de <i>P. aculeata</i> (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).....	76

**Gráfico 27** Massa absoluta do órgão coração (g) dos camundongos após o tratamento por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%)..... 77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanina Aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato Aminotransferase
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CEPA	Comitê de Ética em Pesquisa Animal
CHCM	Concentração de Hemoglobina Corpuscular Média
CN	Controle Negativo
CPF	Concentrado Proteico de Folhas
CPF	Concentrado Proteico de Folhas
CONSEA	Conselho Nacional de Segurança Alimentar
DL <sub>50</sub>	Dose Letal
DPC	Desnutrição Proteico-Calórica
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
EPM	Erro Padrão da Média
FAO	Organização das Nações Unidas para agricultura e Alimentação
FDA	Fibra em Detergente Ácido
FDN	Fibra em Detergente Neutro
FPA	Farinha de <i>Pereskia aculeata</i>
FPA 5%	Inclusão de 5% de farinha de <i>P. aculeata</i>
FPA 10%	Inclusão de 10% de farinha de <i>P. aculeata</i>
FPA 20 %	Inclusão de 20% de farinha de <i>P. aculeata</i>
FPG	Farinha de <i>Pereskia grandifolia</i>
HCM	Hemoglobina Corpuscular Média
HE	Hematoxilina-Eosina
IP	Inibidor de Proteases
MS	Matéria Seca
OECD	Organização para Cooperação Econômica e Desenvolvimento

OECD 408	<i>Repeated Dose 90 - Day Oral Toxicity</i>
OECD 425	<i>Acute Oral Toxicity - Up-And-Down Procedure</i>
P<0,05	Nível de significância de 5%
p.v	Peso vivo
RE	Resolução Especial
SAN	Segurança Alimentar e Nutricional
TACO	Tabela Brasileira de Composição dos Alimentos
UFC	Universidade Federal do Ceará
UNILAB	Universidade Federal da Lusofonia Afro-Brasileira
VCM	Volume Corpuscular Médio

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	25
2.1 Desnutrição e a importância das proteínas na alimentação .....	25
2.2 Segurança alimentar e os desafios de combate à fome e à desnutrição.....	27
2.3 Hortaliças Não-convencionais .....	28
2.4 <i>Pereskia aculeata</i> Miller e seu potencial como suplemento alimentar proteico.....	30
2.5 Perspectivas na utilização de <i>P. aculeata</i> na suplementação alimentar e importância dos ensaios de toxicidade .....	34
2.6 Compostos antinutricionais em <i>P. aculeata</i> .....	36
3 JUSTIFICATIVA.....	39
4 HIPÓTESE CIENTÍFICA .....	41
5 OBJETIVOS .....	41
5.1 Objetivo Geral .....	41
5.2 Objetivos Específicos.....	41
6 METODOLOGIA .....	43
6.1 Obtenção da Planta .....	43
6.2 Depósito da exsicata .....	43
6.3 Animais.....	43
6.4 Preparação da farinha de folhas secas de <i>P. aculeata</i> .....	44
6.5 Determinação da composição elementar de <i>P. aculeata</i> .....	44
6.5.1 <i>Determinação de Matéria Seca Total</i> .....	44
6.5.2 <i>Determinação de Proteína Bruta</i> .....	44
6.5.3 <i>Determinação de Extrato Etéreo</i> .....	45
6.5.4 <i>Determinação de Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Detergente Ácido (FDA)</i> ....	45
6.5.5 <i>Determinação de Matéria Mineral</i> .....	46
6.5.6 <i>Composição de minerais de farinha de P. aculeata</i> .....	46
6.6 Determinação dos compostos antinutricionais .....	47
6.6.1 <i>Inibidores de Tripsina</i> .....	47
6.6.2 <i>Método de redução do Ácido fosfomolibdotúngstico</i> .....	48
6.7 Estimativa da DL <sub>50</sub> .....	49
6.7.1 <i>Preparação da suspensão de P. aculeata</i> .....	49

6.7.2 Estimativa da DL <sub>50</sub> de <i>P. aculeata</i> conforme a OECD 425 ( <i>Acute Oral Toxicity-Up-And-Down Procedure</i> ) .....	49
6.8 Estimativa de toxicidade de acordo com o protocolo OECD 408 ( <i>Acute Oral Toxicity-Up-And-Down Procedure</i> ) .....	50
6.8.1 Preparação da ração modificada com farinha de <i>P. aculeata</i> .....	50
6.8.2 Ensaio de toxicidade no período de 30 e 90 dias.....	51
6.8.3 Análise dos parâmetros bioquímicos .....	52
6.8.4 Análise dos parâmetros hematológicos .....	52
6.8.5 Análise dos parâmetros histológicos.....	53
6.9 Comitê de Ética.....	53
6.10 Análise estatística.....	53
7 RESULTADOS .....	55
7.1 Composição nutricional das folhas de <i>P. aculeata</i> .....	55
7.2 Atividade inibidora de Tripsina em folhas de <i>P. aculeata</i> .....	56
7.3 Quantidade de taninos totais em folhas de <i>P. aculeata</i> .....	56
7.4 Estimativa da DL <sub>50</sub> pelo protocolo da OECD 425 ( <i>Acute Oral Toxicity-Up-And-Down Procedure</i> ) .....	56
7.5 Ensaio de suplementação com farinha de <i>P. aculeata</i> por 30 e 90 dias através da OECD 408 ( <i>Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity</i> ) .....	57
7.5.1 Consumo de água e ração, massa corpórea, sobrevivência e observações comportamentais .....	57
7.5.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos após 30e 90 dias de tratamento. ....	60
7.6 Avaliação dos parâmetros hematológicos após 90 dias de tratamento.....	67
7.7 Avaliação macroscópica e microscópica dos órgãos .....	75
8 DISCUSSÃO .....	80
9 COSIDERAÇÕES FINAIS.....	95
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS. ....	97
ANEXOS. ....	111

## 1 INTRODUÇÃO

O Brasil é considerado o país com a maior diversidade biológica do planeta, com mais de 20% da biodiversidade mundial, onde há cerca de 45.000 espécies vegetais possuindo as mais diversas propriedades e aplicações. Esta vasta biodiversidade de vegetais se notabiliza por possuir diversas propriedades, com destaque para a grande quantidade de nutrientes, como por exemplo, proteínas e minerais (MMA, 2015). Entretanto, ao mesmo tempo em que existe uma grande diversidade de vegetais com potencial alimentício na flora brasileira, muito desse potencial é ainda subutilizado pelas populações, por serem consideradas plantas invasoras ou daninhas e pela escassez em seu conhecimento. Diante dessa limitação, há como uma das consequências a pequena participação da biodiversidade brasileira na matriz agrícola nacional e na produção regional de alimentos (KINUPP; BARROS, 2007).

Com o avanço tecnológico da agricultura, a indústria de alimentos passou a priorizar a utilização de culturas de maior importância econômica, em detrimento de um grande número de espécies que podem servir como complemento alimentar para a população (SOUZA, 2014). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura (FAO), 95% dos componentes da alimentação humana, provém de 30 espécies de plantas, sendo o arroz, milho, trigo e batata, responsáveis por contribuir com 60% da demanda alimentar mundial (FAO, 2010).

Dessa forma, em virtude do acesso restrito por parte de algumas populações às espécies convencionais mais utilizadas na dieta, seja por questões financeiras, comerciais ou geográficas, a preservação e a utilização racional dos recursos fitogenéticos nativos e locais de comunidades agrícolas de todo o mundo, em especial dos países subdesenvolvidos, são necessárias para a manutenção e garantia da segurança alimentar dessas populações, além de terem como garantia a obtenção de alimentos de forma racional e sustentável (FAO, 2015). Com base nesse panorama e levando em consideração que milhões de pessoas ainda sofrem com a fome e desnutrição mundial, a agrobiodiversidade apresenta-se como recurso essencial para que a segurança alimentar seja alcançada (SOUZA, 2012).

Quando se fala de carência nutricional e desnutrição, deparamo-nos com a ausência de nutrientes que comprometem o estado fisiológico do indivíduo. Dentre esses compostos, destacam-se as proteínas, podendo levar o organismo a um colapso metabólico, resultando em um estado que acarreta morbidade e agravamento de possíveis patologias (MONTE, 2000).

Assim, a deficiência de proteínas está intimamente relacionada ao problema da desnutrição mundial. Nessa perspectiva, algumas plantas, dentre elas as hortaliças, apresentam altos teores de proteínas, minerais e vitaminas essenciais ao desenvolvimento do organismo, surgindo como grande potencial para a utilização na suplementação alimentar humana (ROSA; SOUZA, 2003; SILVA, 2005; BRASIL, 2010).

Dentre os principais grupos de plantas utilizados na alimentação humana, podemos destacar as hortaliças não-convencionais. Conceitualmente, são definidas como aquelas presentes em determinadas localidades ou regiões, exercendo influência na alimentação de uma população tradicional. São caracterizadas pelo seu excelente valor nutricional, fácil cultivo e baixo custo. Esses alimentos podem ser uma alternativa nutricional para a dieta de pessoas de baixo poder aquisitivo, substituindo alimentos de alto custo. Também são importantes para a diversificação alimentar, melhorando a qualidade nutricional e proporcionando um estado de segurança alimentar (MAPA, 2010). Embora possuam tais características, ainda não estão inseridas dentro da cadeia produtiva como as hortaliças domésticas convencionais.

Dentre as hortaliças não-convencionais, destaca-se a *Pereskia aculeata* Miller, mais conhecida como Ora-pro-nóbis. É considerado um excelente complemento alimentar, em virtude dos elevados teores de proteína, fibras, cálcio e ferro, sendo muito utilizada e apreciada na culinária mineira (ROCHA *et al.*, 2008).

Entretanto, como preconiza a toxicologia, algumas espécies, mesmo que apresentem substâncias de origem natural, podem ser consideradas agentes tóxicos, dependendo das condições de exposição, como dose administrada ou absorvida, tempo e frequência de exposição e vias de administração (BARROS; DAVINO, 1996). Além disso, as plantas podem apresentar na sua constituição, substâncias capazes de causar efeitos deletérios no organismo, que podem interferir com o funcionamento de órgãos vitais e não-vitais. Assim, apesar da importância e do potencial nutricional comprovado cientificamente das hortaliças não-convencionais, a quantidade de estudos acerca dessas propriedades ainda são insuficientes na área da toxicologia.

Levando em consideração que cerca de 795 milhões de pessoas no mundo não comem o suficiente para serem consideradas saudáveis pela falta de nutrientes na alimentação, a busca por alternativas no setor de alimentos com a utilização de alimentos não-convencionais, atende a uma importante vertente do setor de inovação, uma vez que busca suprir as necessidades nutricionais humanas de forma sustentável, a partir do aproveitamento de alimentos oriundos da biodiversidade nacional, mediante a comprovação de suas

propriedades nutricionais e os seus possíveis efeitos deletérios ao organismo (FAO, 2014; SOUZA, 2014).

Para uma melhor compreensão da importância deste trabalho, a revisão de literatura a seguir abordará aspectos relativos à desnutrição e à importância das proteínas na alimentação, segurança alimentar e os desafios de combate à fome e à desnutrição. Tratará ainda, as hortaliças não-convencionais, com destaque para a *P. aculeata* e seu potencial como complemento alimentar protéico, perspectivas e importância dos ensaios de toxicidade e aspectos antinutricionais na utilização da *P. aculeata* na suplementação alimentar e os compostos antinutricionais de *P. aculeata*.

## 2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1 Desnutrição e a importância das proteínas na alimentação

Do ponto de vista geral, os alimentos têm como função principal fornecer nutrientes necessários para formação e manutenção de células e tecidos. Uma alimentação equilibrada contempla todas as necessidades nutricionais de um indivíduo em termos de macro e micronutrientes, que posteriormente, irão compor o ciclo metabólico. Uma boa nutrição reduz fadigas musculares, lesões, otimiza os depósitos de energia e garante a saúde de forma geral (SHERMAN; COSTILL, 1984; BROUNS *et al.*, 1986; HASSON; BARNES, 1989).

Uma vez que a garantia de bem estar de uma população está relacionada ao acesso a nutrientes em boa quantidade e qualidade, a ausência dos mesmos pode ter efeitos devastadores. Nesse contexto, surgem as definições de desnutrição e subnutrição, caracterizadas pela ausência de nutrientes que acarreta no comprometimento da saúde, ocasionado por uma série de fatores de natureza clínico-social, tais como, pobreza, fome, infecções e dietas pobres ou inadequadas. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), mesmo uma deficiência nutricional moderada é capaz de acarretar sérios prejuízos à saúde humana (BLÖSSNER; DE ONIS, 2005; MS, 2005; WHO, 2005). Dentre esses nutrientes, destacam-se as proteínas como um dos mais importantes para a manutenção dos processos vitais do organismo. Por serem fontes secundárias de reserva energética e constituintes de vários processos no organismo, a sua degradação pode levar a um colapso fisiológico, resultando em um estado que acarreta morbidade e agravamento de possíveis patologias (MONTE, 2000).

Dentre as principais funções das proteínas estão: atuação no crescimento e manutenção dos tecidos, formação hormonal, transporte de substâncias, proteção imunológica, catalisadores de reações orgânicas e substrato para obtenção de energia. Além disso, esses compostos orgânicos possuem funções de transferência de moléculas no sangue, produção de anticorpos, dentre outras funções (CHAVES, 1985; NELSON; COX, 2011).

Uma vez que as proteínas exercem funções de suma importância para o organismo, em casos de fome e insegurança alimentar, a ausência desse nutriente pode acarretar em desnutrição. Essa condição pode ser representada de várias formas, com destaque para a Desnutrição Proteico-Calórica (DPC), considerada o seu quadro clínico mais grave.

A DPC é caracterizada pela falta de calorias e proteínas na alimentação. Pode ser dividida em duas formas agudas de desnutrição: a *Wasting* ou Marasmo, caracterizada pela

perda de peso rápida, juntamente com a perda de tecido adiposo e muscular, reduzindo cerca de 60% do peso corporal; e o Edema Nutricional ou Doença de Kwashiorkor, que é causada pela insuficiente ingestão de proteína e representada pela perda do tecido muscular e manutenção do tecido adiposo (DUBOWITZ, 1965; TRUSSWELL, 1981). A Síndrome de Kwashiorkor foi descrita por volta dos anos trinta, após observações de sintomas em crianças, e é definida como o grave déficit proteico que conduz a uma depleção visceral precoce de aminoácidos, afetando a função celular e reduzindo o consumo de oxigênio. Diante disso, ela pode provocar um estado clínico de edema, hipoalbuminemia e esteatose hepática no organismo (WILLIAMS, 1933; MONTE, 2000).

Além disso, a Deficiência Proteica (DP) pode ser originada de desordem ou quadro de enfermidade resultante de uma dieta inadequada ou não balanceada, ou até mesmo, de uma falha na absorção e assimilação destes elementos dietéticos (HUGHES; KELLY, 2006; MALAFAIA, 2007). Dentre os sintomas clínicos ocasionados pela DP, Vituri *et al.* (2008), ao realizarem estudos com animais alimentados com dietas deficientes em proteínas, observaram que os animais apresentaram uma acentuada redução no consumo alimentar, o que resultou em uma perda acentuada de massa corpórea. Tal premissa se baseia na afirmação de que, por ser o tecido muscular esquelético um reservatório de proteína no organismo, o mesmo torna-se bastante sensível à deficiência proteica (DUBOWITZ, 1965), e dessa forma, quando há deficiência na dieta, esse tecido torna-se alvo de depleção (WATERLOW; WEISZ, 1956; OLIVEIRA *et al.*, 1999).

No que se refere aos efeitos nos órgãos diante de um panorama de DP, Malafaia (2009) observou uma redução significativa na massa do fígado e do baço em testes realizados com animais submetidos a dietas com DP. Em estudo realizado por Oliveira e Angelis (2001), foram observadas reduções de até 90% na concentração de albumina plasmática em camundongos *Swiss* alimentados com dietas com baixo teor proteico (3% de proteínas) e com dieta aprotéica.

Além das informações citadas, a DP predispõe a uma série de complicações graves, incluindo tendência à infecção, deficiência de cicatrização de feridas, falência respiratória, insuficiência cardíaca, diminuição da síntese de proteínas a nível hepático com produção de metabólitos anormais, diminuição da filtração glomerular e produção de suco gástrico (JEEJEEBHOY *et al.*, 1990).

Portanto, a ausência de proteínas em uma dieta compromete de forma significativa o desenvolvimento e o bem estar social de um indivíduo, além de submeter o organismo a uma série de alterações metabólicas, as quais, se não diagnosticadas de forma eficiente e em

tempo hábil, poderão levar ao óbito. Dentro dessa perspectiva, a utilização de plantas alimentícias com elevados teores de nutrientes surge como uma possibilidade em programas de combate à desnutrição.

## **2.2 Segurança alimentar e os desafios de combate a fome e à desnutrição**

Uma vez que a desnutrição é uma doença proeminente nas populações mundiais, debates sobre a garantia de alimentação, qualidade e acesso aos alimentos têm se tornado um dos principais pilares na construção de estratégias de segurança alimentar. O direito irrestrito à alimentação e à nutrição de qualidade a todos os indivíduos do planeta está consignada na Declaração Universal dos Direitos Humanos, que foi posteriormente reafirmado no Pacto Internacional sobre Direitos Econômicos, Sociais e Culturais. Tal protocolo afirma que é dever do Estado garantir o bem-estar social e o direito ao acesso de alimentos necessários ao seu bem-estar e segurança alimentar (UN, 1986).

Dentro desse contexto, surgiu o conceito de Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) definido como a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras da saúde, que respeitam a diversidade cultural e que sejam socialmente econômica e ambientalmente sustentáveis. A consolidação do conceito de SAN possibilitou o fortalecimento de iniciativas governamentais para a elaboração de políticas públicas de segurança alimentar, combate à desnutrição e à pobreza extrema, principalmente a partir do ano de 2003, com a criação do Programa Fome Zero e a recriação do Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (CONSEA), bem como políticas de proteção social e produção agrícola (FAO, 2014).

Analisando os efeitos da desnutrição mundial, a partir de dados fornecidos pela FAO, aproximadamente 795 milhões de pessoas no mundo não comem o suficiente para serem consideradas saudáveis, ou seja, uma em cada nove pessoas permanece subnutrida. Embora o número de pessoas desnutridas no mundo ainda seja bastante significativo, esse número sofreu uma redução de 18,6% da população em 1990-92 para pouco mais de 10,9% da população no período de 2014-16. Do contingente de pessoas com deficiência nutricional no mundo, cerca de 511,7 milhões de pessoas vivem na Ásia e na região do Pacífico; 232,5 milhões na África e 34,3 milhões na América Latina e Caribe (FAO, 2015). Os impactos gerados pela fome e desnutrição são tão proeminentes, que lideram a lista dos 10 maiores

riscos para a saúde humana, matando anualmente mais que a AIDS, malária e tuberculose (UNAIDS, 2010).

Dentro do âmbito nacional, o Brasil era considerado o país da América do Sul com o maior número de subnutridos, possuindo cerca de 15,6 milhões de pessoas até meados dos anos 2000. Porém, no último levantamento realizado em 2009, esse número era de cerca de 10 milhões de pessoas. Esse contingente sofreu redução de 6,9% para 5% da população brasileira, no período de 2004 a 2009 (DE ONIS *et al.*, 2004; FAO, 2014).

Nos últimos anos, a DP tem sofrido uma redução significativa. Entretanto, essa doença continua sendo um relevante problema da saúde pública brasileira, com destaque para a zona rural das regiões Norte e Nordeste, e a zona periférica dos grandes centros urbanos e capitais (MDA, 2010).

Dessa forma, o combate à desnutrição e má distribuição da oferta de alimentos tem gerado iniciativas na busca de alternativas para tais problemas. Este entendimento tem desencadeado decisões para a melhoria econômica das populações, por meio de estratégias e programas para grupos de maior risco nutricional (WORLD BANK, 2016).

No Brasil, observa-se nos últimos anos um esforço governamental para o combate à fome e à pobreza por meio de políticas de inclusão sócioprodutiva e de segurança alimentar. Dentre elas, pode-se citar o programa Brasil Sem Miséria, programa que envolve uma série de ações de fortalecimento de famílias que vivem abaixo da linha da pobreza, a partir do incentivo à implementação de pequenas unidades produtivas familiares, prevendo a articulação com outros programas de aquisição de alimentos e alimentação escolar, para que a produção familiar seja destinada à comercialização dentro da própria comunidade (MDA, 2010; MDS, 2014). Além disso, políticas governamentais, como as utilizadas pelo Instituto Nacional de Nutrição e Alimentação, vêm consolidando medidas para a divulgação e indução de consumo de alimentos alternativos e não-convencionais como estratégia no combate à desnutrição de populações mais carentes (GUIMARÃES *et al.*, 1994).

### **2.3 Hortaliças não-convencionais**

A FAO tem atuado de forma efetiva, alinhada ao plano de atuação semelhante à atuação brasileira, em que se baseia na orientação a países que possuem políticas de combate à desnutrição, por meio do incentivo do fortalecimento do Programa Mundial de Alimentos. Essas medidas têm por natureza o estímulo ao acesso dos alimentos, através de programas locais de inclusão sócioprodutiva, com a finalidade de incremento de alimentos

alternativos ou subutilizados, que possuam propriedades nutricionais relevantes, para que possam ser utilizados como suplementos alimentares na dieta dessas comunidades (FAO, 2009).

Diante do quadro social e econômico de boa parte dos países subdesenvolvidos, o estudo da possível utilização de hortaliças na alimentação doméstica pode contribuir de forma considerável para o aumento da disponibilidade de nutrientes, sendo essa uma fonte de proteínas, fibras, vitaminas e minerais a um baixo custo (MORAIS *et al.*, 2003).

Em relação às hortaliças não-convencionais, embora haja uma carência nos estudos, tem se verificado que esse grupo apresenta teores de macronutrientes e minerais significativamente superiores aos presentes em hortaliças convencionais e comerciais (ALMEIDA *et al.*, 2014; KINUPP *et al.*, 2007; TAKEITI, 2009; BRASIL, 2010). Devido ao seu baixo custo, fácil disponibilidade e valor nutritivo, esses alimentos podem ser uma alternativa para a melhoria do conteúdo de alguns nutrientes na dieta de pessoas de pouco poder aquisitivo, substituindo alimentos de alto custo (BRASIL, 2002).

Esses vegetais, além de nutritivos, produzem uma sensação saborosa ao serem ingeridos e já foram bastante apreciados. Entretanto, ocorreu um processo de esquecimento e desvalorização da sua utilização e das suas propriedades nutricionais. Entre as principais razões desse abandono para o consumo e o cultivo, está à globalização e o crescente uso de alimentos industrializados, em que se observa uma mudança significativa no padrão alimentar dos brasileiros, e perda de características culturais e identidade com relação ao consumo de alimentos regionais (PINTO, 1998; BRASIL, 2002; BRASIL, 2010).

Usualmente, as hortaliças não-convencionais são denominadas "daninhas" ou classificadas apenas como "mato". Todavia, essas espécies possuem uma grande importância ecológica, genética, econômica e cultural nas sociedades onde estão distribuídas (KINUPP, 2009), possuindo uma boa rusticidade. Em geral, são pouco afetadas por pragas e doenças, adequando-se facilmente a cultivos orgânicos e agroecológicos (MAPA, 2010). São ainda caracterizadas como aquelas presentes em determinadas localidades ou região que exercem influência na alimentação de uma população tradicional. Normalmente, não estão organizadas enquanto cadeia produtiva, não despertando o interesse por parte de empresas de sementes, fertilizantes ou agroquímicos (MAPA, 2010).

O cultivo dessas hortaliças no Brasil é feito predominantemente por agricultores familiares em virtude, principalmente, de menor poder aquisitivo dessas populações e de um menor acesso às culturas mais cultivadas e tradicionalmente mais utilizadas (PADULOSI *et al.*, 2002). Além do mais, essas populações exercem papel fundamental na conservação da

biodiversidade e das variedades fitogenéticas locais (GLIESSMANN, 2005; FERREIRA *et al.*, 2009; MAPA, 2010). O resgate e a valorização dessas variedades tradicionais de hortaliças representam ganhos importantes do ponto de vista cultural, econômico, social e nutricional.

Como forma de elencar alguns exemplos de hortaliças não-convencionais da biodiversidade brasileira e com destaque na culinária regional, temos o Jambu (*Acmella oleracea*), componente essencial do tacacá, prato típico da culinária amazônica; Cubiu (*Solanum sessiliflorum*), a qual produz frutos que podem ser usados na tradicional caldeirada, assim como para a elaboração de sucos, sorvetes, doces e geléias; Chicória-de-caboclo (*Eryngium foetidum*), um tempero em alguns pratos, sobretudo, naqueles à base de peixes, mas pode ser utilizada também como ingrediente principal em bolos. Além destas, destaca-se a *P. aculeata*, hortaliça típica da culinária mineira. A sua utilização é tão proeminente nesse Estado, que em 1997 foi criado o Festival do Ora-pro-nóbis no município de Sabará, no Estado de Minas Gerais (KINUPP, 2009).

#### **2.4 *Pereskia aculeata* Miller e seu potencial como suplemento alimentar proteico**

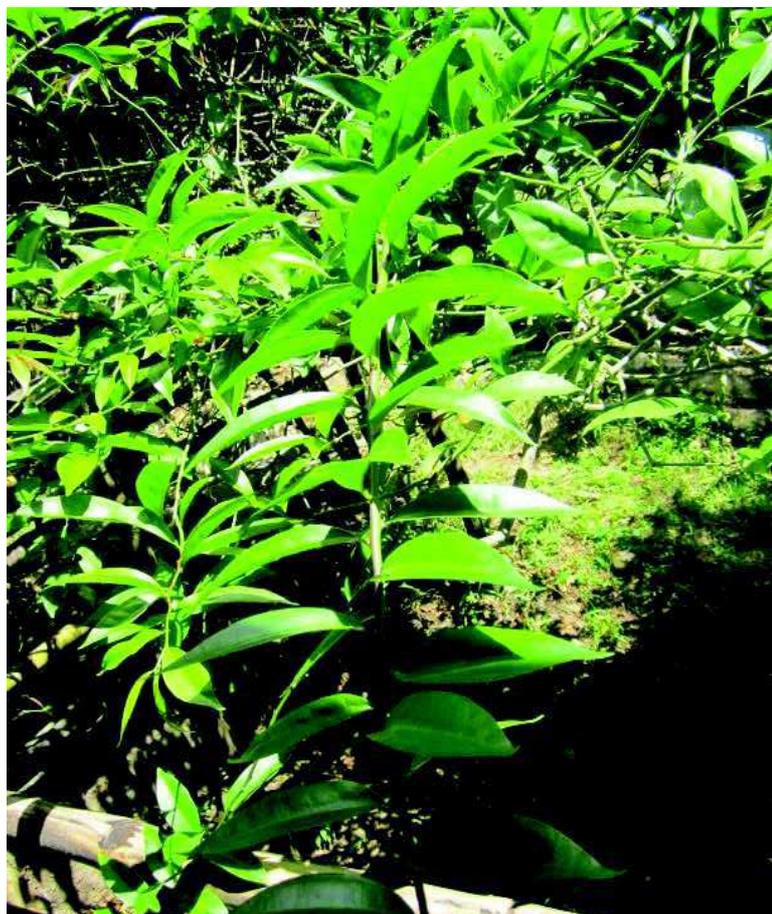
Algumas espécies de *P. aculeata* já demonstraram potencialidade de garantir a segurança alimentar e nutricional devido à grande quantidade de proteínas e nutrientes na sua composição. Tal utilização justifica-se pelo fato das proteínas de origem animal são mais caras e de difícil acesso, especialmente nos países subdesenvolvidos, fazendo-se necessária a utilização de alimentos não-convencionais nessas localidades para atender a demanda por fontes seguras de proteínas que possam ser incluídas na dieta da população. A utilização do Concentrado Proteico de Folhas (CPF) é a forma mais usual de utilização de proteína vegetal nas dietas alimentares ao redor do planeta. No mundo, cerca de 70% das fontes de proteínas consumidas são de origem vegetal e 30% de origem animal. Apesar da fonte de origem vegetal possuir proteína de menor qualidade, constitui a base alimentar da maioria dos povos, por ser ofertada em maior quantidade, destacando-se as sementes oleaginosas e os cereais (GAVA, 2010).

Nesse contexto, a *Pereskia aculeata* Miller (Figura 1) surge como uma espécie a ser explorada pelo fato da sua boa distribuição regional e propriedades funcionais. Tal espécie tem sido atestada por pesquisadores como detentora de um grande potencial para a utilização na suplementação alimentar, por apresentar um alto teor de proteínas. Essa planta pertence ao reino Plantae, classe Magnoliopsida, ordem Caryophyllales, família Cactacea, gênero

*Pereskia*. O seu nome é originário do latim e significa “rogai por nós”. É conhecida popularmente como Ora-pro-nóbis, Lobrobó, Groselha-da-américa, sendo classificada como nativa não endêmica. Esta hortaliça possui ramos com generosos espinhos, folhas suculentas, carnosas e comestíveis, com a presença de mucilagem, sendo utilizada em vários pratos da culinária regional, como farinhas, saladas, refogados, tortas e massas alimentícias, como o macarrão, além de remédios caseiros (MERCÊ *et al.*, 2001; ROSA; SOUZA., 2003; DUARTE; HAYSASHI, 2005; KINUPP, 2006; TOFANELLI; RESENDE, 2011; ALMEIDA; CORRÊA, 2012; ZAPPI *et al.*, 2012)

Esta espécie possui características agrônômicas bastante favoráveis ao seu cultivo, sendo uma planta rústica, vigorosa e de fácil propagação (TOFANELLI; RESENDE, 2011). Apresenta baixa demanda hídrica e baixa incidência de doenças, além de sobreviver a longos períodos de seca, chuvas contínuas e geadas brandas. Essas características favorecem o cultivo doméstico como uma hortaliça de baixo custo, principalmente se cultivada em regiões do País com baixas incidências de chuva, como a região Nordeste (MADEIRA; SILVEIRA, 2010; SANTOS *et al.*, 2012). No Brasil, ela é encontrada em quase todo o território nacional, com predominância na região Centro-Oeste e os Estados de Minas Gerais e Bahia. É caracterizada como uma trepadeira arbustiva que ocorre principalmente em regiões áridas ou levemente áridas.

**Figura 1.** *Pereskia aculeata* Miller



Fonte: acervo do autor.

A *P. aculeata* é considerada um excelente complemento nutricional devido ao seu alto conteúdo de proteínas e em média, ela contém 20% de teor proteico e 85% de digestibilidade, fibras, ferro, cálcio, sais minerais e vitaminas. Além disso, possui elevados valores de aminoácidos essenciais, destacando-se a lisina, leucina e valina. (ROSA; SOUZA, 2003; DUARTE; HAYASHI, 2005; ROCHA *et al.*, 2008; MAPA, 2010; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010; MAZIA; SARTOR, 2012). Tais afirmativas podem ser corroboradas por estudos realizados por Silva e Pinto (2005), que observaram que esta planta possui teores de proteínas de 24,73% e elevados teores de minerais, com destaque para o cálcio (3.800 mg/100g) e ferro (28,12 mg/100g). Rocha *et al.* (2008), em suas pesquisas com a confecção de macarrão a base de folhas secas de *P. aculeata*, também identificaram elevados teores de proteínas (22,93%), fibras (12,64%), cinzas (18,07%), lipídios (3,64%), carboidratos (36,18%) e calorias de (269,16 Kcal).

Outra importante propriedade nutricional é a sua alta concentração de ferro. Em estudos realizados por Silva e Pinto (2005) e Takeiti *et al.* (2009), os autores observaram que as folhas dessa espécie apresentavam teores de ferro, variando de 14,18g a 28,12g por 100g de matéria seca. Fazendo uma correlação entre as concentrações de ferro observadas pelos dois autores, quando comparadas aos valores de alimentos tradicionais e historicamente notabilizados pela grande concentração de ferro, presentes na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO) (2011), observa-se que a *P. aculeata* possui valores superiores a vários desses alimentos, conforme demonstrado na Tabela 1.

**Tabela 1.** Concentração de ferro de diferentes alimentos comparados com as folhas de *P. aculeata*.

Alimento	Teores de Fe/100 g de MS
<i>P. aculeata</i>	14,18 g a 28,12 g
Beterraba crua	0,3 g
Beterraba cozida	0,2 g
Couve manteiga refogada	0,5 g
Espinafre refogado	0,6 g
Fígado bovino grelhado	5,8 g
Grão de bico cru	5,4 g
Lentilha crua	7,0 g
Feijões fradinho cru	5,1 g
Feijão preto cru	6,5 g
Feijão roxo cru	6,9 g
Feijão carioca cru	8,0 g

Fonte: Silva e Pinto (2005); TACO (2011); Takeiti *et al.* (2009).

Outra característica de destaque é a grande quantidade de lisina presente nas folhas, a qual compõe o grupo dos aminoácidos essenciais necessários para produção de proteínas. Almeida Filho e Cambraia (1974) relataram que o teor de lisina do *P. aculeata* foi 23,1 vezes superior aos valores de lisina de couve e de alface e 7,2 vezes superior ao do espinafre, plantas reconhecidas pelo seu alto valor nutricional.

Além das grandes propriedades nutricionais já citadas, há vários relatos na literatura sobre a utilização de *P. aculeata* no combate às mais diversas doenças. Alguns estudos têm demonstrado que esta planta, além das propriedades apresentadas, possui características

medicinais, atividade antitumoral, antirreumática, antiúlcera e anti-inflamatória (TAN *et al.*, 2005).

Souza *et al.* (2012) afirmaram em seus estudos que a ampliação e melhoria do uso e conhecimento sobre plantas tradicionais, ou hortaliças não-convencionais, podem contribuir para a melhoria do padrão nutricional, bem-estar e renda da população rural, além da redução da extinção das espécies do ponto de vista ambiental e cultural.

Assim, devido à quantidade relativamente grande de proteínas e outros componentes importantes, é considerada uma alternativa para o incremento e o enriquecimento da qualidade na alimentação. Entretanto, ao mesmo tempo em que a presente espécie apresenta propriedades nutricionais pertinentes, a segurança da ingestão desses alimentos deve ser atestada por meio de pesquisas científicas.

## **2.5 Perspectivas na utilização de *P. aculeata* na suplementação alimentar e importância dos ensaios de toxicidade**

Diante do exposto, após análise das propriedades nutricionais da *P. aculeata* na alimentação humana como fonte de suplemento alimentar para o combate à fome e à desnutrição, surge a perspectiva da utilização de farinhas das folhas dessa espécie, por órgãos governamentais, na construção de estratégias de garantia de boa alimentação. Entretanto, antes do desenvolvimento de produtos para tais fins, são necessários testes laboratoriais para a determinação de possíveis efeitos de substâncias presentes nas folhas e a sua reação em organismos vivos. Dentre estes testes, podemos destacar os ensaios de toxicidade aguda e crônica via oral.

O principal problema decorrente do uso de vegetais é o desconhecimento dos fatores antinutricionais, substâncias naturais provenientes do seu metabolismo secundário. Os vegetais podem acumular altas concentrações dessas substâncias, podendo originar reações tóxicas e/ou interferir na biodisponibilidade e digestibilidade de alguns nutrientes (SANTOS 2006).

Os ensaios de toxicidade indicam o tempo ou a concentração em que uma determinada substância, de um material de estudo, é potencialmente deletéria, após o contato ou interação com a membrana ou um sistema biológico específico, podendo não produzir um efeito adverso se a concentração do produto for baixa ou o tempo de contato for insuficiente. Ressalta-se que a concentração e o tempo de exposição estão diretamente relacionados (FONSECA, 1991).

Desta maneira, os testes de toxicidade são desenvolvidos e aplicados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos, após a exposição humana à determinada substância química, e dimensionar a toxicidade relativa de substâncias específicas, como um medicamento, um praguicida, um agente químico industrial, dentre outros, utilizando, principalmente, modelos animais para este propósito (FORBES; FORBES, 1994; CAZARIN *et al.*, 2004).

Maciel *et al.* (2002) afirmaram que face à importância das propriedades tóxicas que compostos químicos apresentam, os mesmos só devem ser utilizados se certas questões forem respondidas através das comprovações científicas, sendo necessária a ampliação dos estudos das plantas brasileiras, principalmente nas áreas de fitoquímica e etnofarmacologia.

Para a determinação da avaliação toxicológica, existem testes específicos e regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Segundo a Resolução Especial (RE) nº 90, de 16/03/2004, os estudos toxicológicos podem ser ensaios de longa duração ou de doses repetidas, podendo ser subdivididos em experimentos de quatro semanas (30 dias de tratamento) ou de doze semanas (90 dias de tratamento), via oral (ANVISA, 2004). Além da determinação de propriedades tóxicas, tais testes são realizados para discernir sobre a segurança e confiabilidade do substrato, atestando a sua característica de toxicidade ou de segurança. Existem os protocolos internacionalmente reconhecidos e preconizados por instituições, como aqueles publicados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (*Organization for Economic Co-operation and Development – OECD*), que atuam na regulação dos testes agudos, subagudos e crônicos, por meio dos guias experimentais estatísticos, que atestam a confiabilidade da propriedade tóxica de uma determinada substância, com a menor utilização possível de animais a partir da curva dose-resposta (OECD, 2001).

No âmbito da utilização de folhas de *P. aculeata* na alimentação humana e seus respectivos efeitos no organismo, alguns autores afirmam que a mesma possui características atóxicas em humanos (DAYRELL; VIEIRA, 1977; MERCÊ *et al.*, 2001). Santos *et al.* (2011), ao realizarem um estudo com extrato etílico bruto das folhas de *P. aculeata* em hemácias humanas, observaram ausência de atividade hemolítica, afirmando que essa planta seria atóxica, uma vez que não houve lise celular.

Entretanto, em outro estudo realizado por Silva *et al.* (2012), testando a inclusão de folhas de *P. aculeata* na dieta de ratos machos recém-desmamados, verificou-se que o grupo que recebeu a planta apresentou redução nos desempenhos dos testes de posição e reflexo de flexão, afirmando com isso que a utilização dessa planta como suplemento alternativo pode

implicar em prejuízos no desenvolvimento de ratos na fase inicial. Nesse mesmo estudo, também se avaliou o efeito da inclusão de folhas na ração comercial, como forma de substituição da fonte de proteína convencional, e a restrição parcial de proteínas na dieta sobre ganho de peso, consumo alimentar, hematócrito e nas proteínas plasmáticas totais. Com relação ao ganho de peso, pôde-se perceber que o grupo alimentado com dieta contendo a planta não conseguiu ter o mesmo ganho de peso ponderal que os outros grupos. Com relação às análises hematológicas, não houve influência. Já com relação ao resultado de proteínas plasmáticas totais, observaram uma redução significativa nesses valores nos grupos com dieta à base da *P. aculeata*. Assim, para esses ensaios, os autores concluíram que a suplementação alimentar com folhas de *P. aculeata* pode influenciar de forma negativa no ganho de peso ponderal, ingestão alimentar e concentração de proteínas plasmáticas totais.

Em outro estudo mais atual realizado pela mesma equipe, só que em ratos fêmeas, com o objetivo de avaliar as propriedades toxicológicas aguda de folhas de *P. aculeata* por meio da administração via gavagem em diferentes concentrações (0 mg; 1250 mg; 2500 mg ou 5000 mg/kg de peso corporal), não foi verificada alteração significativa nos parâmetros avaliados: ingestão alimentar, peso por animais, excreção fecal e reações clínicas e comportamentais. No entanto, três animais que receberam a maior concentração apresentaram diarreia 4 e 8 horas após a administração do extrato, permanecendo um ainda com esse sintoma após 24 horas (SILVA *et al.*, 2014).

## 2.6 Compostos antinutricionais em *P. aculeata*

Em geral, as plantas podem ser sensíveis e estarem sujeitas a fatores ambientais, tais como ataque de organismos patógenos, estresse à dissecação, temperaturas baixas ou elevadas e ferimento causado por insetos herbívoros (WASTERACK *et al.*, 2006). Em virtude dessa exposição, os vegetais desenvolveram mecanismos de defesa, que podem ser agrupados em duas categorias: as defesas constitutivas e induzidas. As primeiras englobam as defesas pré-existentes durante o desenvolvimento vegetal, podendo envolver estruturas vegetais, como parede celular e cutícula, haja vista que estas estruturas dificultam o processo de lesão causado por insetos mastigadores e patógenos (WITTSTOCK; GERSHENZON, 2002). Já as defesas induzidas estão envolvidas na resposta ao ataque de predadores ou presença de patógenos. São caracterizadas por modificações estruturais na parede celular da planta hospedeira relacionadas à deposição de calose, lignina e produção de compostos fenólicos que conferem maior rigidez à parede celular vegetal (WITTSTOCK;

GERSHENZON, 2002). Além disso, ainda ocorre à produção de compostos químicos em resposta a estímulos físicos e químicos, devido a lesões provocadas por insetos herbívoros ou ataque de patógenos, por meio de substâncias biologicamente ativas (VALUEVA *et al.*, 2003).

Citando um desses principais mecanismos, destacamos os inibidores de proteases (IP) que são polipeptídios de baixo peso molecular, com capacidade de inibir a ação catalítica de enzimas proteolíticas presentes em várias classes de insetos e pragas, além de participarem da germinação de sementes, desenvolvimento vegetativo, morte celular programada, além de proteger o tecido vegetal de maiores danos (SOLOMON *et al.*, 1999; CHOUGULE *et al.*, 2003; SIVAKUMAR *et al.*, 2006; ANTUNES, 2008).

Os inibidores proteicos (IP) presentes em plantas constituem uma classe de proteínas de interesse com grande potencial biotecnológico, correspondendo a 2% do total de proteínas presentes em todos os organismos, em vias metabólicas e em vias de sinalização celular, e estão amplamente distribuídos no reino vegetal, pois são proteínas capazes de inibir as atividades de tripsina, quimiotripsina, amilase, carboxipetidase, dentre outras (CHOUGULE *et al.*, 2003; PARDE, 2009; CALDERON *et al.*, 2010; DUARTE *et al.*, 2010; RAWLINGS *et al.*, 2012; AGHAALI *et al.*, 2013). Esses inibidores expressam suas propriedades ao se ligarem ao sítio ativo de enzimas proteolíticas, inibindo assim a entrada de moléculas de substratos, conseqüentemente, desestabilizando a atividade de proteólise. Portanto, os inibidores podem atuar como pseudo-substrato no sítio ativo da proteinase digestiva, formando um complexo proteico estável, limitando a velocidade da proteólise (TIFFIN; GAUT, 2001).

Em estudos realizados por Almeida *et al.* (2014) com duas espécies do gênero *Pereskia*, observou-se atividade inibitória de tripsina na farinha de *P. aculeata* (1,82 UI mg<sup>-1</sup>) e de *P. grandifolia* (1,03 UI mg<sup>-1</sup>). Já em estudo realizado por Pompeu *et al.* (2014) observou-se uma atividade de inibição de tripsina de 35% com 0,06 UI mg<sup>-1</sup>. Esses resultados diferem dos resultados obtidos Dayrell e Vieira (1977) que não observaram a presença do inibidor de tripsina nas amostras de *P. aculeata*.

Traçando um paralelo com outras espécies, se observa que os dados descritos por esses autores é menos que os achados de Ortega-Nieblas *et al.* (2001), para sementes de cinco espécies de cactos colunares (54 a 66 UTI mg<sup>-1</sup>), e Pinto *et al.* (2001a) para limbos de taioba com nervura (2,14 UI mg<sup>-1</sup>) e sem nervura (3,36 UI mg<sup>-1</sup>)

Além dos inibidores de proteinase, podemos destacar como substâncias com efeitos tóxicos ou antinutricionais os compostos fenólicos, mais especificamente os taninos. A dieta

humana é composta por vários alimentos, contendo quantidade relevante de taninos (REDDY *et al.*, 1985). Os taninos podem causar mudanças no metabolismo, hemorragias, lesões no trato intestinal, gastroenterites, necrose hepática e nefrites aos animais expostos. Além dessas propriedades, esses compostos têm a capacidade de se combinar com as enzimas digestivas, proteínas, carboidratos, aminoácidos, vitaminas e minerais, pela formação de complexos estáveis, impedindo a absorção dos nutrientes pelo organismo e provocando alterações de paladar (FIALHO; PINTO, 1992; MUELLER-HARVEY; MCALLAN, 1992; ORTIZ *et al.*, 1994; SILVA; SILVA, 1999).

Essa interação entre taninos e proteínas ocorre por meio de ligações de hidrogênio entre os grupos hidroxifenóis dos taninos e os grupos carbonila das ligações peptídicas. Segundo Makkar (1988), uma vez complexados, a utilização da proteína é reduzida, o que afeta a digestibilidade e interfere na absorção e retenção de alguns minerais e vitaminas.

No que tange a presença de taninos em *P. aculeata*, Almeida *et. al* (2014) observaram uma quantidade de Compostos fenólicos de 19,34 (mg. 100 g<sup>-1</sup>) em *P. aculeata* e 19,17 (mg. 100 g<sup>-1</sup>) em *Pereskia grandifolia*. Já em estudos realizados por Souza (2014) as amostras de *Pereskia aculeata* apresentaram teores de compostos fenólicos variando entre 58,37 e 81,29 (mg. 100 g<sup>-1</sup>).

Mais informações acerca das perspectivas de estudos relacionados à nutrição e propriedades toxicológicas de *P. aculeata*, consultar o Anexo 1 deste documento.

### 3 JUSTIFICATIVA

Frente aos dados apresentados, debates acerca do combate à desnutrição, por meio da suplementação alimentar proteica e garantia da alimentação a todos os cidadãos, vêm acontecendo há décadas. O direito irrestrito à alimentação e à nutrição de qualidade a todos os indivíduos do planeta está consignado na Declaração Universal dos Direitos Humanos, o qual foi posteriormente reafirmado no Pacto Internacional sobre Direitos Econômicos, Sociais e Culturais. Tal protocolo afirma que é dever do Estado garantir o bem-estar social e o direito ao acesso de alimentos necessários ao seu bem-estar e segurança alimentar (UN, 1986).

Assim, a deficiência de proteínas está intimamente relacionada ao problema da desnutrição mundial. Nessa perspectiva, as plantas do gênero *Pereskia*, em especial a espécie *P. aculeata*, por apresentar um alto teor de proteínas, minerais e vitaminas essenciais ao desenvolvimento do organismo, tem sido atestada por alguns pesquisadores como detentora de um grande potencial para a utilização na suplementação alimentar (ROSA; SOUZA, 2003; SILVA, 2005; BRASIL, 2010), sendo utilizado como suplemento alimentar em várias regiões do Brasil.

Uma vez que se utilizam modelos e estratégias nutricionais para solucionar a problemática da fome mundial, surge a necessidade e tentativa de validação de métodos analíticos modernos, visando o controle de qualidade das plantas nativas, abrindo assim, a perspectiva de uma maior otimização do potencial da biodiversidade mundial para tal finalidade.

Embora o número de pesquisas e publicações venha crescendo nos últimos anos, ainda são escassos os estudos sobre o efeito toxicológico, em diferentes sistemas fisiológicos e bioquímicos no organismo, sobre diferentes períodos de exposição, a partir da utilização e consumo de folhas de *P. aculeata*. Embora alguns autores afirmem que a presente espécie não possui efeitos tóxicos ou antinutricionais, estudos recentes demonstram que houve alterações significativas em vários parâmetros bioquímicos, hematológicos e fisiológicos analisados.

Dessa maneira, antes do fornecimento de espécies com potencial nutricional para a população, estudos mais detalhados devem ser realizados para a comprovação da segurança de suas substâncias no organismo humano, visto que o uso dessa planta é bastante difundido pela população de algumas regiões do Brasil, e ao mesmo tempo, apresenta propriedades

significativas e relevantes com relação à presença de nutrientes, podendo ser utilizada como recurso de combate à desnutrição.

Uma vez que sua ausência de toxicidade possa ser atestada, abre-se um enorme precedente para a utilização dessa espécie e de outras espécies nativas brasileiras, e que possuem uma boa adaptabilidade aos climas tropicais, podendo ser cultivadas em outros continentes, como o africano.

Desta forma, o processo de estruturação de combate à fome ganha um grande aliado a, *P. aculeata*, na construção de estratégias para a implementação em países subdesenvolvidos, que são os mais atingidos pela fome e desnutrição.

## 4 HIPÓTESE CIENTÍFICA

Diante do exposto, foi formulada a seguinte hipótese científica:

A utilização crônica das folhas de *P. aculeata* na alimentação não promove alterações metabólicas identificadas por análises comportamentais, hematológicas, bioquímicas e/ou histológicas caracterizadas como sinais de toxicidade no organismo de camundongos alimentados cronicamente com ração suplementada com farinha das folhas da espécie vegetal citada.

## 5 OBJETIVOS

### 5.1 Objetivo geral

Avaliar se as folhas de *P. aculeata* promovem possíveis efeitos toxicológicos e/ou antinutricionais, em camundongos submetidos à suplementação alimentar crônica utilizando diferentes teores de farinha de folhas dessa espécie vegetal.

### 5.2 Objetivos específicos:

- Determinar as propriedades bromatológicas das folhas de *P. aculeata*, bem como a composição centesimal de minerais presentes nas mesmas, com a finalidade de estimar se os valores presentes em espécies cultivadas na região Nordeste são semelhantes aos já registrados;
- Avaliar se a farinha de folhas de *P. aculeata* possui propriedade de inibição de tripsina, caracterizando um fator antinutricional de indisponibilidade de proteínas;
- Determinar o teor de taninos totais, com o intuito de identificar possíveis fatores antinutricionais e/ou tóxicos nas folhas de *P. aculeata*;
- Estimar a  $DL_{50}$  da *P. aculeata*, por meio do protocolo estabelecido pela OECD 425 – Organisation for Economic Co-operation and Development (*Acute Oral Toxicity-Up-And-Down Procedure*);
- Determinar o efeito da dieta de suplementação com farinha de *P. aculeata* sobre os parâmetros:
  - Bioquímicas: glicose, colesterol total, triglicerídeos, uréia, creatinina, globulina, proteínas totais, albumina, aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT);

- Parâmetros hematológicos: leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM), concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM), e o número de plaquetas;
- Parâmetros histológicos dos órgãos fígado, rins e coração.

## 6 METODOLOGIA

### 6.1 Obtenção da Planta

As amostras de folhas de *P. aculeata* foram coletadas no sítio Vale da Biodiversidade, situado no município de Mulungu – Ceará. A localização do ponto de coleta é representada pelas seguintes coordenadas: Longitude: 038° .31' .3928"; Latitude: 03° .44' .9775" e Altura: 14.587 metros.

### 6.2 Depósito da exsicata

O depósito da exsicata ocorreu no Herbário Prisco Bezerra da UFC, sob o número de registro 058870.

### 6.3 Animais

Os animais utilizados no presente estudo foram camundongos *Swiss* fêmeas (27 a 32 g) provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará. Antes do início de cada experimento, os animais foram aclimatados, pelo menos durante uma semana, na sala de experimentação animal do Laboratório de Pesquisa em Bioquímica Clínica da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC.

Esses animais foram acondicionados em caixas de polipropileno com tampas aramadas, as quais foram alocadas em estantes com ventilação controlada e mantidos a uma temperatura de  $22 \pm 2$  °C, com ciclos de claro/escuro de 12 em 12 h e circulação de ar controlada.

Receberam água *ad libitum* durante todos os dias do experimento. Em relação à dieta de sólidos, foi oferecida aos animais ração padrão comercial (Nuvilab CR-1), durante o período de aclimação e do protocolo experimental de *Up-and-Down*, descrito posteriormente. Já os animais submetidos aos ensaios de toxicidade de suplementação protéica por 30 e 90 dias, foram alimentados com a mesma ração padrão e ração modificada com diferentes níveis de farinha *P. aculeata* (FPA).

#### **6.4 Preparação da farinha de folhas secas de *P. aculeata***

As amostras das folhas da planta *P. aculeata* foram lavadas em água corrente. Após esse processo, elas passaram pela etapa de estabilização em estufa de pré-secagem de circulação de ar forçada, a 110 °C por 10 min. Logo em seguida, a amostra foi pré-secada a 55 °C, durante 72 h, para a obtenção de um material com um menor teor de umidade. Após esse processo, as folhas secas foram trituradas em moinho de facas e moinho de Fritish Pulverisette 14, com o objetivo de obter uma amostra com aspecto farináceo e com granulometria de 0,5 mm.

#### **6.5 Determinação da composição elementar de *P. aculeata***

A determinação bromatológica foi realizada no Laboratório de Nutrição Animal do Departamento de Zootecnia da UFC.

##### **6.5.1 Determinação de Matéria Seca Total**

Após a coleta, as folhas foram levadas ao laboratório e lavadas em água corrente. Após esse processo, as folhas foram submetidas à desidratação em estufa de ventilação de ar forçada, à temperatura de 55 °C, durante 72 h. O teor de umidade parcial foi determinado por meio da diferença de peso do material coletado no início (folhas frescas) e no final do processo de desidratação (folhas secas). Foram utilizados aproximadamente 544,29 g de folhas frescas. Durante o processo de secagem foram realizadas pesagens sucessivas para calcular o teor de umidade das amostras de folhas. A Matéria Seca Total da farinha de *P. aculeata* foi determinada através da desidratação da amostra em estufa, a 105 °C, por mais 24 h, para obtenção de um produto com peso constante e isento de umidade.

##### **6.5.2 Determinação de Proteína Bruta**

Utilizou-se a metodologia de Kjeldahl (DETMANN *et al.*, 2012) para a determinação da proteína bruta, realizando os procedimentos em triplicatas. Este método baseia-se em três etapas distintas: digestão, destilação e titulação. Primeiramente, preparou-se a mistura de digestão (100 g K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> + 10 g CuSO<sub>4</sub> + 1 g Se). Em seguida, adicionou-se em tubos de ensaios 0,5 g da amostra de *P. aculeata* juntamente com 1mL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e 0,7 mL da mistura

de digestão anteriormente preparada. No mesmo tubo, adicionaram-se 2 mL de ácido sulfúrico. Em seguida o material foi levado para o bloco digestor, a temperatura de 150 °C, por 30 min, sendo elevando a cada 30 min, em 50 °C, até alcançar 350 °C. Aguardou-se esfriar até 50 °C, e adicionaram-se 20 mL de água destilada.

Em sequência, os tubos de ensaios foram levados a um destilador de nitrogênio, no qual foram acrescentados 10 mL de H<sub>2</sub>BO<sub>3</sub> 2% + indicador e 10 mL de NaOH 50%. Para a titulação utilizou-se HCl 0,1 N. Com os volumes de HCl utilizados para cada amostra na titulação, determinou-se, por meio da equação a seguir, a quantidade de proteína bruta:

*Proteína bruta: [(Volume mL HCl (amostra – branco) x fator x 0,14 x 6,25) / Peso da amostra]*

Obteve-se como branco o valor 0,01 mL e utilizou-se como fator de correção 0,97.

### **6.5.3 Determinação de Extrato Etéreo**

Para a determinação do teor de extrato etéreo, foi utilizada a metodologia de Goldfish (DETMANN *et al.*, 2012), dividida em três etapas: extração, remoção e pesagem. Na primeira etapa foi realizada a extração da porção apolar por refluxo contínuo de um solvente orgânico (Éter petróleo P.A). Foram pesados 2 g de amostra, acondicionados em um cartucho de celulose. Os cartuchos foram introduzidos em copos de extração de gordura e levados à estufa não ventilada, por 2 h, a 105 °C. Após esse processo, os mesmos foram levados ao aparelho extrator de gordura do tipo Goldfish. Nessa etapa, foram adicionadas 100 mL de éter petróleo em cada copo, por um período de 4 h.

Em seguida, o solvente foi removido parcialmente por reciclagem do solvente até a sua precipitação no fundo do copo. Em seguida, os copos retornaram à estufa não ventilada a 105 °C, por mais 30 min, até que todo o éter restante evaporasse. Posteriormente, o material foi levado ao dessecador e pesado novamente através da diferença do último peso do copo.

### **6.5.4 Determinação de Fibra em Detergente Neutro (FDN) e Detergente Ácido (FDA)**

Para a determinação do teor de fibra, foi utilizada a metodologia de Van Soest (VAN SOEST, 1994). Para a realização do ensaio, foram utilizados sacos F57 (Ankom), com marcador previamente fervidos em detergente neutro, por 15 min. Os sacos foram lavados com água destilada quente e levados à estufa ventilada, a 60 °C, durante 24 h, e depois por

mais 2 h, a 105 °C. Após esse processo, os sacos foram resfriados em dessecador e pesados posteriormente.

Foram utilizadas 800 mg de amostra, adicionadas aos saquinhos. Os mesmos foram colocados em um aparelho analisador de fibras Ankom 220, acrescentando uma solução de detergente neutro à temperatura ambiente, juntamente com alfa amilase termoestável. Em seguida, esse material foi aquecido no aparelho Ankom 220, por 1 h, a 105 °C. Na determinação de fibra em detergente ácido utilizou-se a mesma quantidade de amostra, entretanto, os sacos foram aquecidos à mesma temperatura e tempo, em aparelho autoclave e utilizando detergente ácido.

Após essa etapa, os sacos foram lavados com água destilada quente para a retirada do detergente e levados então à estufa de circulação de ar, por 48 h, a 60 °C, e sequencialmente, por 2 h, a 105 °C. Em seguida os sacos foram resfriados em dessecador e pesados.

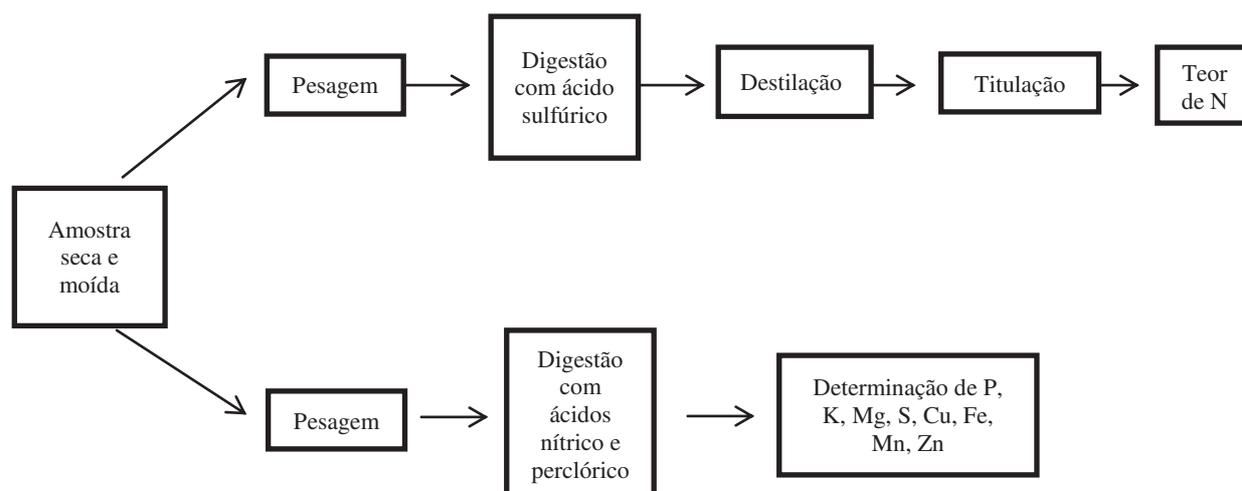
#### ***6.5.5 Determinação de Matéria Mineral***

Determinou-se por meio da calcinação de 2 g da amostra seca em altas temperaturas. A amostra previamente pesada em balança analítica, colocada na mufla, a 600 °C, por 4 h, para que ocorresse a completa combustão da matéria orgânica. Completado o tempo, a amostra foi resfriada em dessecador e, depois, em temperatura ambiente, em que foi pesada para a medição da diferença da massa inicial e final para determinação da porcentagem de matéria inorgânica. O ensaio foi realizado em triplicata.

#### ***6.5.6 Composição de minerais de farinha de *P. aculeata****

Essa metodologia é constituída de três etapas. Na primeira, a amostra sofre digestão, utilizando-se ácido nítrico e ácido perclórico, em que se destrói toda a matéria orgânica e possibilita a mineralização de todos os elementos. De forma geral, essa etapa possibilita a determinação de fósforo, potássio, enxofre, cobre, ferro, manganês e zinco. Na segunda etapa, a matéria orgânica sofre oxidação, com a ajuda de ácido sulfúrico e catalisador, possibilitando a determinação de nitrogênio separadamente (Figura 2).

**Figura 2.** Modelo da metodologia de Diagnose Foliar.



Fonte: Malavolta (1997)

Na determinação de nitrogênio, pesou-se 0,2 g de amostra, sendo essa dissolvida em uma solução de 15 mL de ácido sulfúrico. A digestão ocorreu por 1 h, com o aumento de temperatura gradativa até atingir 335 °C. Após a completa digestão da matéria orgânica, o material foi resfriado para a determinação de N a partir da metodologia de Kjeldahl.

Na determinação dos restantes dos minerais, pesou-se 0,5 g de amostra, que foi dissolvida em 0,4 mL de solução com ácido nítrico (65%), repousando por 12 h. Em seguida esse material foi aquecido até 120 °C para digestão parcial da matéria orgânica. Ao final desse processo, foram adicionados 0,2 mL de ácido perclórico (70%) e a temperatura elevada até 180 °C. Com o fim desse procedimento, a solução foi resfriada e acrescida a ela água pura. Em seguida o teor de minerais foi quantificado por meio das respectivas metodologias: o fósforo foi determinado por fotolorimetria, potássio por fotometria de chamas, e cálcio, magnésio, ferro, cobre, zinco e manganês por espectrofotômetro de absorção atômica.

## 6.6 Determinação dos compostos antinutricionais

### 6.6.1 Inibidores de Tripsina

O ensaio para determinação de tripsina foi feito de acordo com a metodologia descrita por Kakade, sofrendo algumas modificações (HAMERSTRAND, *et al*, 1981). A FPA (40 mg) foi suspensa em 1 mL de NaOH 0,01 N, deixada sob agitação constante por 3h, à

temperatura ambiente, com um repouso de 30 min após esse período. Após esse tempo, foram retiradas alíquotas de 0,5 mL dos sobrenadantes, que foram misturadas com 0,5 de NaOH 0,01 N. As soluções resultantes foram centrifugadas a 14.000xg por 5 minutos. Inicialmente, foi construída uma curva padrão, por meio das seguintes etapas: alíquotas de 10 a 30 µL de tripsina (0,3 mg/ml) foram utilizadas. Em seguida, foi adicionado o tampão Tris-HCl 50 mM, pH 7,5, contendo CaCl<sub>2</sub> 20 mM até o volume de 800 µL. Os tubos foram novamente incubados em banho-maria, a 37 °C, por 15 min e, em seguida, foi adicionada uma solução para interromper a reação, composta por 120 µL de ácido acético 30%. As leituras de absorvância foram realizadas em espectrofotômetro a 410 nm.

A atividade inibitória de tripsina foi expressa em unidades de inibição, que representam a diminuição de 0,01 da absorvância da atividade enzimática. Os ensaios foram realizados em triplicata e com provas em branco, em que a reação foi parada antes da adição do substrato.

### ***6.6.2 Método de redução do Ácido fosfomolibdotúngstico***

Inicialmente foi preparada uma solução estoque com 1,5 g da amostra de FPA e transferida para um erlenmeyer de 250 mL. Foi adicionado a ele 150 mL de água destilada e aquecido em banho-maria durante 30 minutos a uma temperatura de 60 °C. Em seguida o material foi resfriado em água corrente e o conteúdo transferido para balão volumétrico de 250 mL. Após esse processo o erlenmeyer foi lavado com água destilada e esse conteúdo contendo ainda a farinha de FPA foi transferido para o balão volumétrico. Ao final desse processo o volume do balão volumétrico foi completado com água destilada. Em seguida o material sofreu decantação e filtração com papel filtro, dispersando os primeiros 50 mL filtrados.

Para a solução amostra de taninos toais, foi retirado uma alíquota de 5 mL da solução estoque e transferido para um balão de 25 mL, completando o restante do volume com água destilada. Posteriormente foram retirados 2 mL da solução amostra e acrescidos a ela 1 mL do reagente fosfomolibdotúngstico e 10 mL de água destilada em outro balão volumétrico de 25 mL. Ao final, o volume foi completado com solução de carbonato de sódio a 29% (p/v).

A absorvância foi determinada a 760 nm em espectrofotômetro após 30 min do preparo da amostra, utilizando água destilada para ajuste do zero. Todo o ensaio foi realizado em triplicata.

## **6.7 Estimativa da DL<sub>50</sub>**

### ***6.7.1 Preparação da suspensão de *P. aculeata****

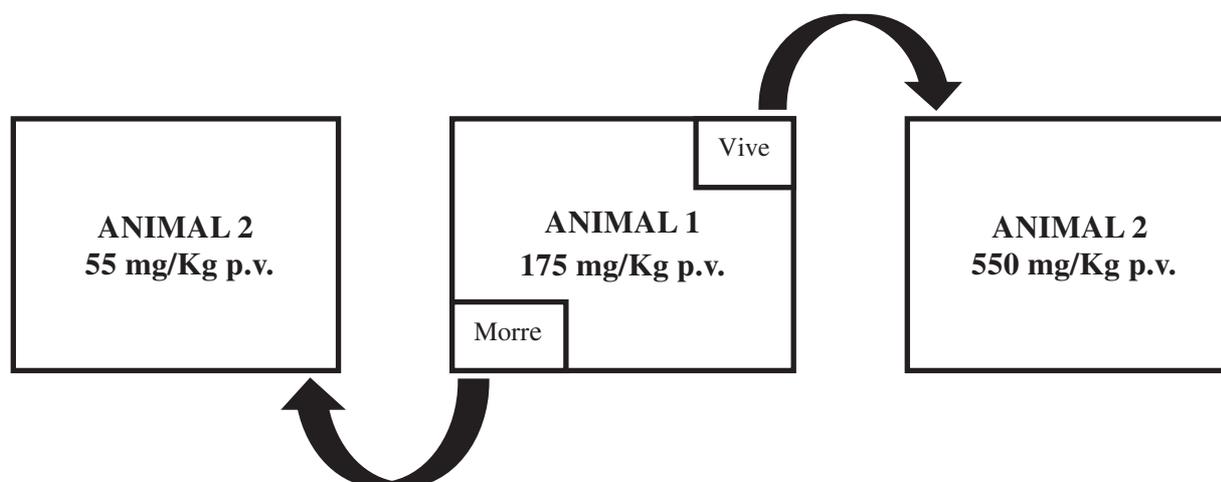
Foram preparados quatro diferentes suspensões à base de FPA em quatro diferentes níveis de concentração (175 mg/kg; 500 mg/kg; 2000 mg/kg; 5000 mg/kg) acrescidos a uma substância veículo (carmelose a 0,5%) de forma que as concentrações presentes na suspensão para o teor de farinha atendessem aos níveis recomendados pelo ensaio de toxicidade aguda preconizado pela OECD 425. O material foi acondicionado em embalagens plásticas para a preservação das suas propriedades.

### ***6.7.2 Estimativa da DL<sub>50</sub> de *P. aculeata* conforme a OECD 425 (Acute Oral Toxicity-Up-And-Down Procedure)***

Foram utilizados camundongos fêmeas com idade entre 4 e 5 semanas, com peso médio de 28 g. A ração convencional e água foram fornecidas à vontade, com exceção das 6 h de jejum que precediam a administração das diferentes doses de suspensão de FPA, bem como 1 hora após o tratamento, na qual os animais foram submetidos a jejum alimentar para evitar interferência na absorção da farinha da planta. Tanto as doses a serem administradas, bem como o número de animais a serem utilizados e a estimativa da DL<sub>50</sub> foram determinados pelo algoritmo estabelecido pelo programa AOT 425 StatPgm.

A dose inicial utilizada de FPA foi de 175 mg/Kg p.v. administrada por via oral (gavagem), com a progressão ou regressão para as doses seguintes, se relacionando com a sobrevivência ou não do animal, respeitando um intervalo de 48 h entre as administrações, de acordo com as recomendações da OECD 425 (Figura 03).

**Figura 3.** Representação esquemática da escolha da dose para estimativa da  $DL_{50}$  de *P. aculeata* conforme a OECD 425.



Fonte: Morais (2014).

Após o período das 48 h iniciais, cada animal foi observado por 11 dias após a primeira administração, totalizando 14 dias de observação, quanto ao possível aparecimento de sinais de toxicidade (desvios comportamentais, mudanças na pele, pelo, olhos, mucosas bucais e oculares, respiração, tremores, convulsão, salivação, diarreia, letargia e coma), sendo esses animais sacrificados por deslocamento cervical ao final desse período.

## 6.8 Estimativa de toxicidade de acordo com o protocolo OECD 408 (*Acute Oral Toxicity-Up-And-Down Procedure*)

### 6.8.1 Preparação da ração modificada com farinha de *P. aculeata*

A dieta modificada com as folhas de *P. aculeata* foi composta por ração convencional e diferentes níveis de inclusão de farinha da planta estudada, cujas concentrações estabelecidas foram: 5%, 10% e 20% de nível de inclusão na ração convencional (FIETZ; SALGADO, 1999; ALMEIDA, 2012).

A FPA foi acrescida à ração convencional previamente triturada em moinho de facas e moinho de Fritish Pulverisette 14. Esses componentes foram misturados em bateadeira industrial até a completa homogeneização dos dois materiais. Em seguida, foi acrescido carmelose a 2%, atuando como agente agregante, em quantidade suficiente para promover aglutinação da ração.

Posteriormente, os *pellets* obtidos foram submetidos à secagem, a 55 °C, por 48 h, com o objetivo de eliminar a umidade contida no agente agregante. A ração padrão sofreu o mesmo processo, para simular todos os procedimentos feitos no preparo da ração modificada.

Os procedimentos de confecção da suspensão e da farinha de ração de *P. aculeata* foram realizados no Laboratório de Farmacotécnica na Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC.

### **6.8.2 Ensaio de toxicidade no período de 30 e 90 dias**

O estudo da toxicidade no período de 30 e 90 dias com *P. aculeata* visou avaliar possíveis efeitos tóxicos de alguma substância presente nas suas folhas. A determinação da toxicidade oral usando doses repetidas de acordo com a RE nº 90 da ANVISA estabelece os ensaios subdivididos em experimentos de quatro semanas (30 dias de tratamento) e de doze semanas (90 dias de tratamento).

Foram utilizados 60 camundongos fêmeas da espécie *Swiss*, distribuídos em quatro grupos de 15 animais, por sua vez, organizados em subparcelas de dois grupos, contendo 7 e 8 animais, respectivamente. Os quatro grupos foram compostos por: Controle negativo (CN), animais alimentados com ração padrão Nuvilab CR-1; Grupo com 5% de inclusão de farinha de *P. aculeata* (FPA 5%); Grupo com 10% de inclusão de farinha de *P. aculeata* (FPA 10%) e o Grupo com 20% de inclusão de farinha de *P. aculeata* (FPA 20%).

A cada 30 dias a massa corpórea dos animais dos grupos era aferida, e o consumo de água e ração era examinado semanalmente. Observações quanto ao aparecimento de sinais de toxicidade e ocorrência de letalidade.

Após 30 e 90 dias de tratamento, os animais foram submetidos a uma coleta sanguínea pelo plexo orbital, com jejum prévio de 6 h, utilizando-se microtubos com dois tipos de anticoagulantes, heparina sódica (parâmetros bioquímicos) e EDTA (parâmetros hematológicos). Também foram confeccionados esfregaços sanguíneos, isentos de anticoagulante, para posterior contagem diferencial dos leucócitos. Em seguida, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e procedeu-se à retirada dos órgãos fígado, rins e coração, por meio de técnicas cirúrgicas adequadas, e cada órgão fresco foi pesado e os valores da massa dos órgãos foram registrados. Além disso, esses mesmos órgãos foram submetidos à análise histológica como descrito a seguir no item 6.7.5.

Os parâmetros bioquímicos avaliados foram glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina, globulina, proteínas totais, albumina, AST e ALT. Já os parâmetros hematológicos analisados foram leucócitos, hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, HCM, CHCM e contagem do número de plaquetas.

### ***6.8.3 Análise dos parâmetros bioquímicos***

Para a determinação das variáveis bioquímicas (glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina, globulina, proteínas totais, albumina, AST e ALT), a coleta foi realizada em microtubos do tipo Ependorff<sup>®</sup> contendo 20 µL de heparina sódica (5000 UI/mL) diluída de 1:10 em soro fisiológico. Decorrido meia hora da coleta, as amostras foram centrifugadas a 3500 rpm (Centrífuga EV-025M- EVLAB<sup>®</sup>) durante 15 min. Em seguida, retirou-se o plasma (sobrenadante) e congelou-o a -20 °C para posteriores dosagens, respeitando-se a estabilidade para cada um dos analitos avaliados.

As quantificações dos parâmetros foram realizadas através de kits enzimáticos colorimétricos da empresa Labtest<sup>®</sup> e Bioclin<sup>®</sup>. Para tanto, seguiu-se as recomendações dos fabricantes, utilizando espectrofotômetro semi-automático Labquest<sup>®</sup>.

As análises bioquímicas e hematológicas foram realizadas no Laboratório de Análises Clínicas e Toxicológicas da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da UFC.

### ***6.8.4 Análise dos parâmetros hematológicos***

Para a determinação dos parâmetros hematológicos como hemoglobina, hematócrito, HCM, HCMC, VCM, número de leucócitos e número de plaquetas, utilizou-se o sangue total coletado em microtubos do tipo Ependorff<sup>®</sup>, contendo 20 µL de EDTA (10 g/dL) como anticoagulante. Os esfregaços sanguíneos foram confeccionados isentos de anticoagulantes, os quais foram corados com panótico rápido para a contagem diferencial dos leucócitos.

Os valores absolutos das variáveis acima mencionadas foram obtidos através do aparelho semi-automático Symex KX-21N Roche<sup>®</sup>, cuja metodologia baseia-se no princípio da impedância e espectrofotometria. Previamente à inserção da amostra no analisador, o sangue era cuidadosamente homogeneizado.

A contagem diferencial dos leucócitos em neutrófilos e linfócitos para obtenção dos valores relativos foi realizada através da contagem diferencial de 100 células nucleadas (microscópio Olympus CX41<sup>®</sup> - aumento de 100x).

#### **6.8.5 Análise dos parâmetros histológicos**

Uma vez coletados, os órgãos fígado, rins e coração, foram realizadas clivagens de acordo com cada órgão, e os mesmos foram fixados em Formol a 10% por um tempo de 72 h. Após fixação, os órgãos foram então desidratados em concentrações crescentes de álcool (70 a 100%), diafanizados em xilol, impregnados e inclusos em parafina, e uma vez montado os blocos, os mesmos foram cortados com o auxílio de um micrótomo em intervalos de 5 µm. As lâminas contendo as seções foram então coradas pelo método de Hematoxilina – Eosina (HE) para avaliação histológica com o auxílio de um microscópio óptico (Olympus<sup>®</sup> - CX41<sup>®</sup>). Na avaliação histológica foram considerados alguns parâmetros como indicativos patológicos a depender do órgão avaliado. Todos os procedimentos histológicos foram realizados no Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Ovarianos Pré-antrais do Programa de Pós-Graduação em Ciências Veterinárias da Universidade Estadual do Ceará (UECE).

#### **6.9 Comitê de Ética**

Todos os protocolos experimentais realizados atenderam aos princípios éticos nacionais e internacionais referentes à pesquisa e experimentação com animais de laboratório. De acordo com as normas exigidas, o presente projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEPA) da UFC, sob o número de protocolo e registro n° 9/2016, podendo ser observado no Anexo 2 deste documento.

#### **6.10 Análise estatística**

Os dados obtidos das determinações bromatológicas, bioquímicas, hematológicas, análise macroscópica e microscópica dos órgãos foram plotados e tabulados no programa de análise estatística Graphpad Prism 5.0 e Microsoft Office Excel 2013<sup>®</sup> para análise estatística e geração de gráficos e tabelas. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média (E.P.M). Para analisar as diferenças estatísticas entre os grupos experimentais foi

realizada a Análise de Variância (ANOVA), seguida de pós-teste de Tukey, considerando um nível de significância de 5% ( $P < 0,05$ ).

## 7 RESULTADOS

### 7.1 Composição nutricional das folhas de *P. aculeata*

Através da determinação de matéria seca verificou-se a percentagem de água nas folhas de *P. aculeata*, sendo de 85,99%, com Matéria Seca Total de 14,01%.

Com o material triturado, realizou-se a análise bromatológica para a determinação dos componentes das folhas da planta estudada em questão. Os resultados podem ser observados na Tabela 2.

**Tabela 2.** Valores nutricionais das folhas de *P. aculeata* expressos em Matéria Seca.

<b>Farinha de <i>P. aculeata</i></b>	
<b>Análise</b>	<b>Teor em Matéria Seca % (g. 100 g<sup>-1</sup>)</b>
Proteína Bruta	13,04
Extrato Etéreo	4,29
Carboidratos	20,43
Fibra em Detergente Neutro	34,29
Fibra em Detergente Ácido	13,91
Resíduo Mineral	14,04

Os valores de minerais encontrados na FPA são apresentados na Tabela 3.

**Tabela 3.** Teor de minerais das folhas de *P. aculeata*

<b>Minerais</b>	<b>Farinha de <i>P. aculeata</i> (mg. 100 g<sup>-1</sup>)</b>
Nitrogênio	2.240,00
Fósforo	170,00
Potássio	2.590,00
Cálcio	2.710,00
Magnésio	520,00
Ferro	24,34
Cobre	1,34
Zinco	3,12
Manganês	14,14

## 7.2 Atividade inibidora de Tripsina em folhas de *P. aculeata*

Para a amostra analisada em questão foi realizada uma análise para a determinação de atividade inibitória de tripsina. Observou-se que esse percentual foi de 35% na FPA, sendo 0,114 UI mg<sup>-1</sup> MS de unidade de inibição de proteínas.

## 7.3 Quantidade de taninos totais em folhas de *P. aculeata*

Para o material de farinha das folhas de *P. aculeata* foi realizada uma análise para a determinação do teor de taninos na matéria-prima vegetal. Foi observada uma concentração de 0,40% de taninos totais na FPA.

## 7.4 Estimativa da DL<sub>50</sub> pelo protocolo da OECD 425 (*Acute Oral Toxicity-Up-And-Down Procedure*)

A dose inicial de *P. aculeata* administrada, por via oral, ao primeiro animal foi de 175 mg/Kg p.v do animal. Após a administração, foram feitas observações quanto ao comportamento do camundongo, objetivando verificar algum efeito tóxico. No decorrer desse ensaio, o animal apresentou durante a primeira hora de administração da solução de FPA e carmelose, leve taquicardia, piloereção e taquipneia durante os 30 minutos iniciais. Após esse período, o animal apresentou comportamento normal durante todo o restante da observação no período de 1 a 24 h após a administração, não apresentando, portanto, o surgimento de sinais de toxicidade nesse período, permanecendo então o animal vivo. Dessa forma, 48 h depois foi possível administrar a dose de 550 mg/Kg ao segundo animal. Da mesma forma como ocorreu com o primeiro animal, o segundo não apresentou sinais de toxicidade e sobreviveu ao término das 48 h. Portanto, o terceiro animal recebeu a dose de 2000 mg/Kg. Esse animal também não apresentou sinais de toxicidade ou possíveis efeitos deletérios, e também sobreviveu ao período de 48 h. Essa dose foi administrada a mais dois animais diferentes por mais dois dias, seguindo as orientações estabelecidas pelo programa AOT 425 StatPgm utilizado para se realizar os testes limites.

Como todos os animais estudados sobreviveram a esta etapa do protocolo, realizou-se uma última etapa com dose de 5000 mg/Kg, administrada ao sexto animal participante do estudo. Após 48 h, observou-se que o animal não apresentou sinais tóxicos e permaneceu saudável e vivo durante esse período. Assim, foram utilizados novamente mais dois animais e

administrada a mesma dose. Como os demais, esses animais não apresentaram sinais de intoxicação ou alterações comportamentais. Dessa forma, encerrou-se o ensaio de toxicidade oral aguda, uma vez que os três animais subsequentes receberam a dose de 2000 mg/kg e 5000 mg/kg e permaneceram vivos. O resumo das atividades segue demonstrado na Tabela 4.

**Tabela 4.** Pesos inicial e final dos camundongos após administração de suspensão de farinha das folhas de *P. aculeata* via oral, bem como observação e o aparecimento de sinais de toxicidade e mortalidade.

	Dose (mg/Kg)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Observação por 1 h	Observação por 6 h	Observação por 12 h	Observação por 24 h	Mortalidade
Animal 1	175	30	33	Taquicardia, Piloereção, Taquipneia	AS	AS	AS	-
Animal 2	500	28	30	AS	AS	AS	AS	-
Animal 3	2000	28	32	AS	AS	AS	AS	-
Animal 4	2000	28	30	AS	AS	AS	AS	-
Animal 5	2000	27	30	AS	AS	AS	AS	-
Animal 6	5000	28	31	AS	AS	AS	AS	-
Animal 7	5000	29	32	AS	AS	AS	AS	-
Animal 8	5000	28	31	AS	AS	AS	AS	-

\*AS = ausência de sinais de toxicidade.

## 7.5 Ensaio de suplementação com farinha de *P. aculeata* por 30 e 90 dias através da OECD 408 (*Repeated Dose 90-Day Oral Toxicity*)

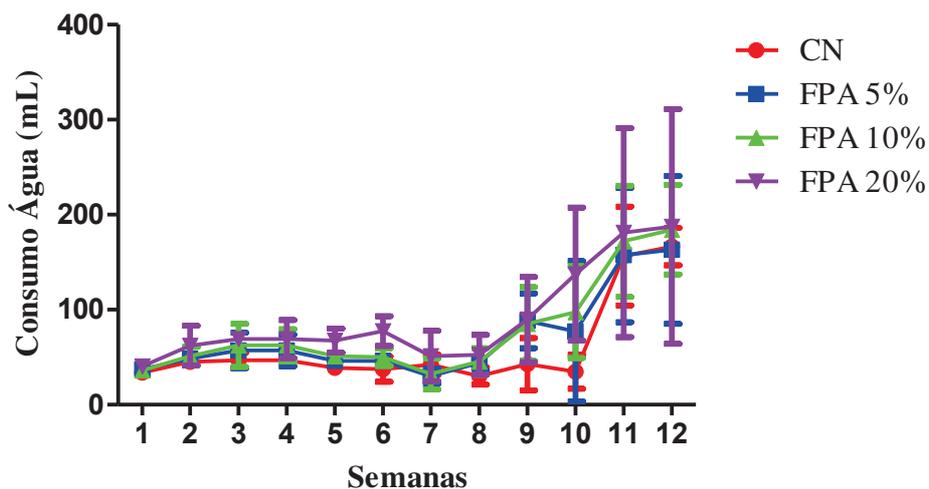
### 7.5.1 Consumo de água e ração, massa corpórea, sobrevivência e observações comportamentais

O tratamento com doses repetidas, realizado através da inclusão de FPA na dieta de camundongos pela via oral, nas concentrações de 5%, 10% e 20% durante os 30 e 90 dias de experimento, não resultou na modificação do padrão de consumo de água e ração, comparando-os com o controle negativo. Também não foi observada nenhuma morte ou modificação visível no padrão comportamental dos animais.

Observou-se que o consumo médio de água, ração e ganho de massa corporal (Gráficos 01, 02 e 03) não diferiram estatisticamente entre os grupos participantes da pesquisa.

Entretanto, destaca-se uma elevação numericamente no consumo de água nos grupos FPA 20% e FPA 10%, a partir da semana 8, quando comparado com os demais grupos do Controle Negativo e FPA 5%, que foram a partir da semana 10 (Gráfico 01).

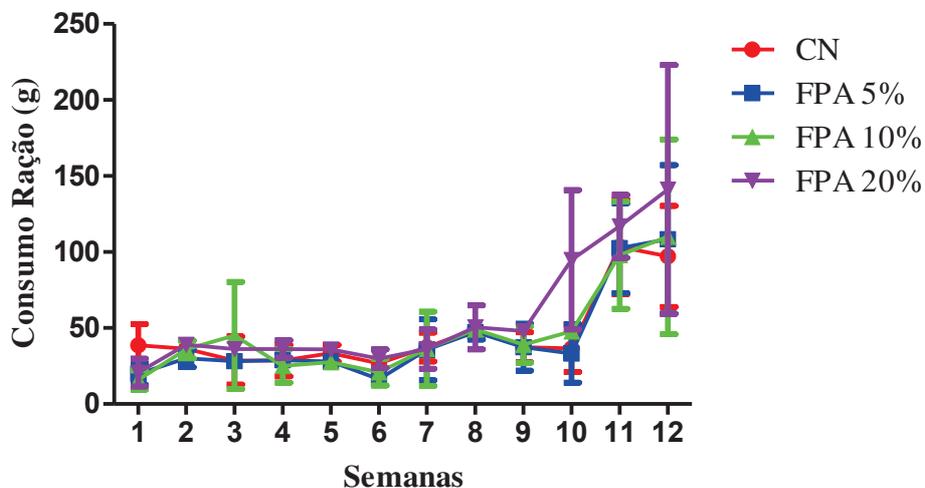
**Gráfico 01.** Consumo semanal médio de água (mL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

O consumo médio de ração foi maior numericamente nos grupos FPA 10% e FPA 20%, ressaltando maior consumo a partir das semanas 10 a 12, quando comparados com os demais grupos do controle negativo e FPA 10%, sem que houvesse diferença significativa (Gráfico 02).

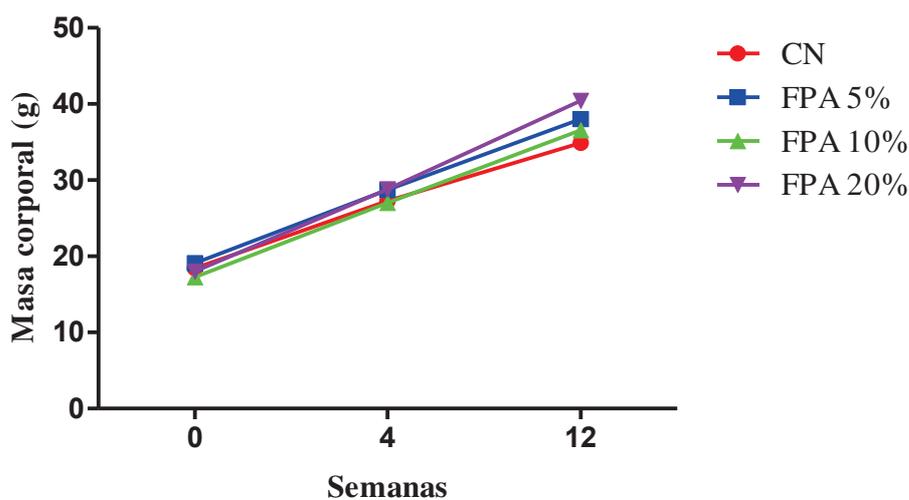
**Gráfico 02.** Consumo semanal médio de ração (g) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

Percebeu-se ganho de massa corporal numericamente maior nos grupos FPA 20% e FPA 5% (Gráfico 03).

**Gráfico 03.** Ganho de massa corpórea (g) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM).

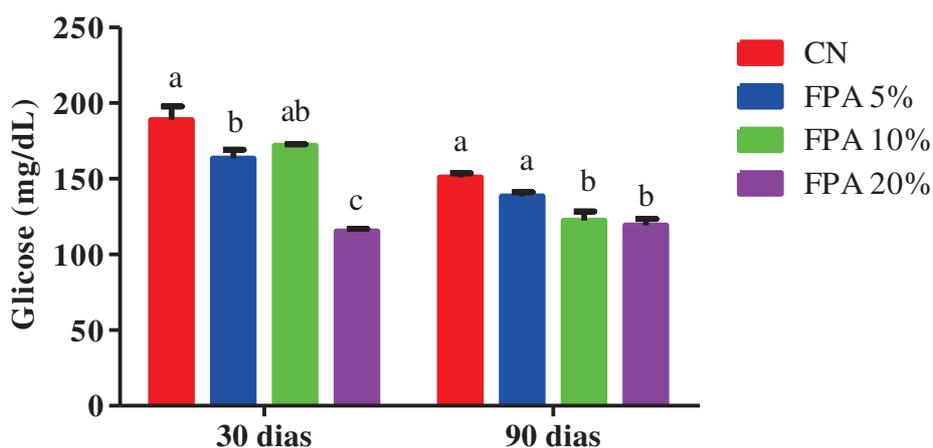
Quanto aos aspectos gerais de bem estar, os animais tratados com FPA pareciam saudáveis, não apresentando sinais de toxicidade, tais como perda de peso, mudanças no aspecto do pêlo, olhos, mucosas bucais e oculares, respiração, aparecimento de tremores e inflamação, convulsão, salivação, diarreia, letargia e coma.

### 7.5.2 Avaliação dos parâmetros bioquímicos após 30 e 90 dias de tratamento

Após 30 e 90 dias foram observadas modificações significativas nos parâmetros bioquímicos. A concentração plasmática de glicose teve seus valores reduzidos no grupo FPA 20% ( $115,30 \pm 1,64$  mg/dL) quando comparado aos grupos CN ( $188,80 \pm 8,95$  mg/dL), FPA 5% ( $163,50 \pm 5,83$  mg/dL) e FPA 10% ( $172,00 \pm 0,78$  mg/dL), correspondendo a reduções de 38,93% e 32,96%, respectivamente no período de 30 dias.

Para a concentração plasmática de glicose no período de 90 dias, os valores do grupo FPA 20% ( $119,20 \pm 4,15$  mg/dL) e FPA 10% ( $122,40 \pm 5,94$  mg/dL) apresentaram valores menores quando comparados ao grupo CN ( $151,00 \pm 2,74$  mg/dL) e FPA 5% ( $138,40 \pm 2,65$  mg/dL), equivalendo a uma redução de 21,05% e 18,94%, respectivamente, quando comparado ao grupo CN (Gráfico 04).

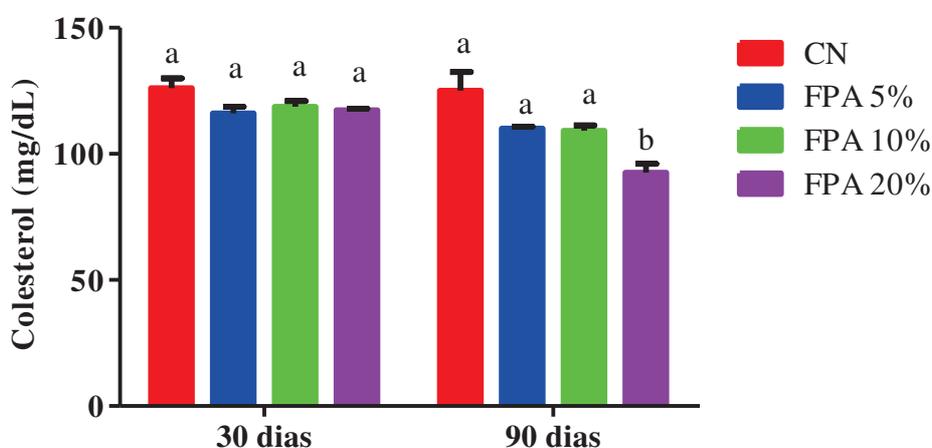
**Gráfico 04.** Concentração plasmática de glicose (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

A concentração plasmática de colesterol não apresentou diferença significativa no período de 30 dias. Entretanto, teve seu valor reduzido de forma significativa no grupo FPA 20% ( $92,60 \pm 3,42$  mg/dL) quando comparado ao grupo CN ( $125,00 \pm 7,43$  mg/dL), FPA 5% ( $110,00 \pm 0,78$  mg/dL) e FPA 10% ( $109,2 \pm 2,12$  mg/dL) correspondendo a uma redução de 25,92%, no período de 90 dias (Gráfico 05).

**Gráfico 05.** Concentração plasmática de colesterol (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).

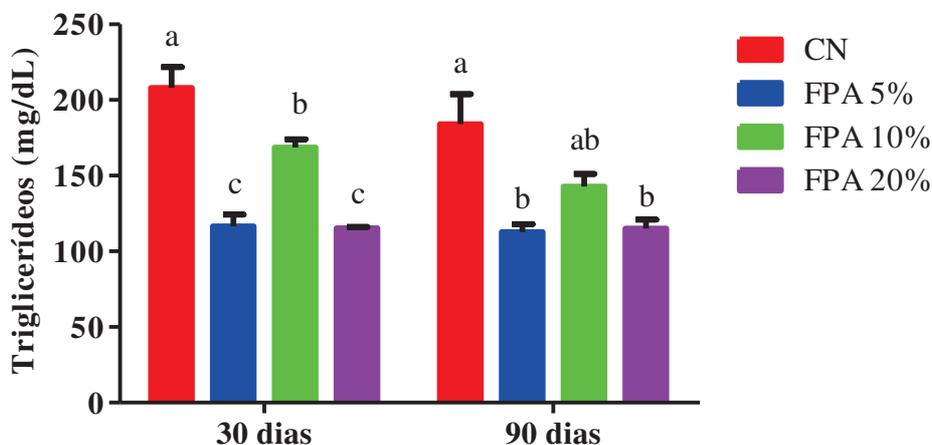


Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>a,b,c,d</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

A concentração plasmática de triglicerídeos apresentou-se reduzida no período de 30 dias nos grupos FPA 5% ( $116,50 \pm 7,73$  mg/dL) e FPA 20% ( $115,30 \pm 0,75$  mg/dL) quando comparados ao grupo CN ( $208,00 \pm 13,72$  mg/dL) e ao grupo FPA 10% ( $168,70 \pm 5,26$  mg/dL) correspondendo a uma redução de 43,99% e 44,56%, respectivamente, em comparação ao grupo CN.

No período de 90 dias, a concentração plasmática de triglicerídeos se apresentou ainda menor nos grupos FPA 5% ( $112,80 \pm 5,17$  mg/dL) e FPA 20% ( $115,00 \pm 6,01$  mg/dL), quando comparados ao CN ( $184,00 \pm 19,93$  mg/dL). Esses valores de redução correspondem a 38,69% e 37,5%, respectivamente (Gráfico 06).

**Gráfico 06.** Concentração plasmática de triglicerídeos (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).

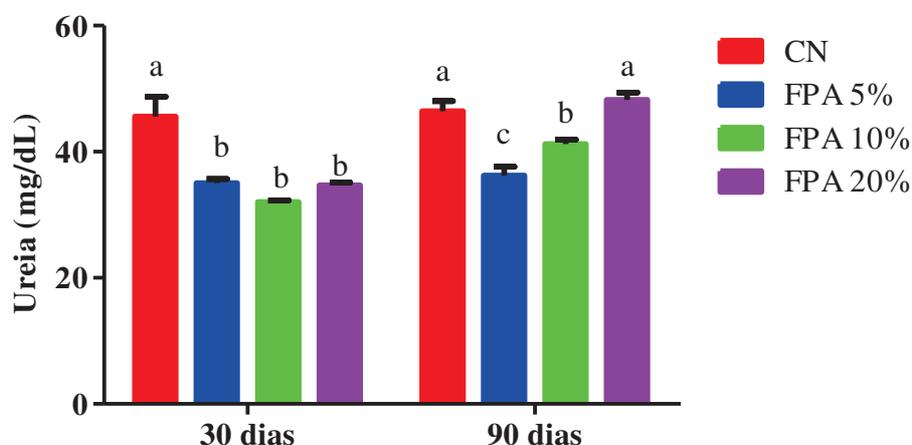


Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Para a concentração plasmática de ureia, importante marcador da função renal, observou-se valores reduzidos comparando os três grupos experimentais FPA 5% ( $35,00 \pm 0,69$  mg/dL), FPA 10% ( $32,00 \pm 0,29$  mg/dL) e FPA 20% ( $34,67 \pm 0,45$  mg/dL) com CN ( $45,60 \pm 3,13$  mg/dL), no período de 30 dias.

No período de 90 dias, essa concentração plasmática de ureia também se apresentou reduzida no grupo FPA 5% ( $36,20 \pm 1,43$  mg/dL) e FPA 10% ( $41,20 \pm 0,70$  mg/dL), quando comparados ao FPA 20% ( $48,20 \pm 1,17$  mg/dL) e ao grupo CN ( $46,40 \pm 1,61$  mg/dL) (Gráfico 07).

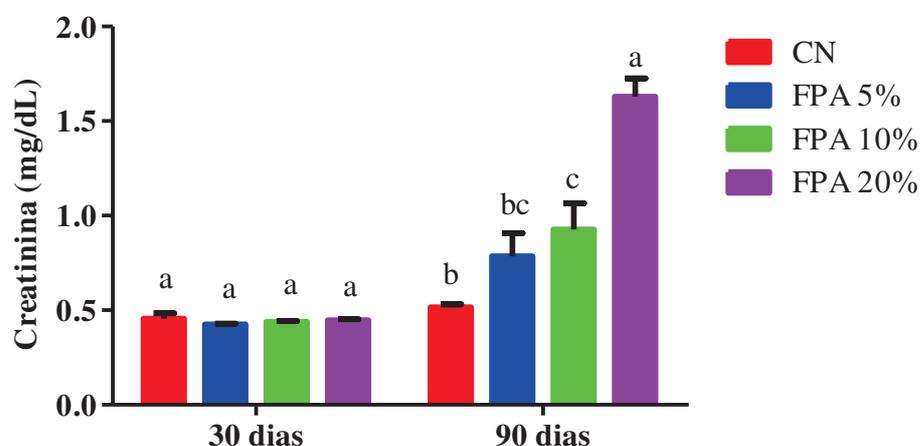
**Gráfico 07.** Concentração plasmática de ureia (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Não foram observadas diferenças estatísticas para a concentração plasmática de creatinina entre os grupos que receberam a farinha no período de 30 dias. Já com relação a essa concentração no período de 90 dias, a mesma apresentou valores elevados no grupo FPA 20% ( $1,63 \pm 0,09$  mg/dL) quando comparado ao CN ( $0,51 \pm 0,01$  mg/dL), FPA 5% ( $0,78 \pm 0,12$  mg/dL) e FPA 10% ( $0,92 \pm 0,13$  mg/dL), representando uma aumento de 43,55% em relação ao CN, período de 90 dias (Gráfico 08).

**Gráfico 08.** Concentração plasmática de creatinina (mg/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).

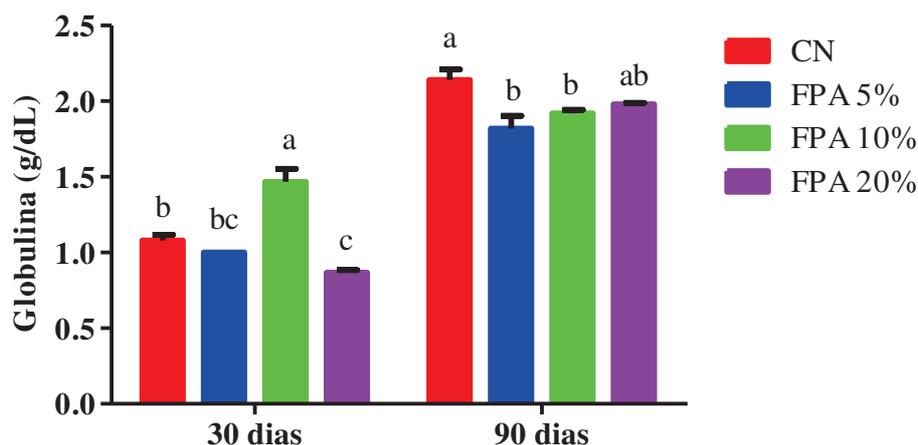


Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Com relação à concentração plasmática de globulina, verificou-se valores elevados no grupo FPA 10% ( $1,46 \pm 0,08$  g/dL) quando comparado aos grupos CN ( $1,08 \pm 0,03$  g/dL), FPA 5% ( $1,00 \pm 0,00$  g/dL) e FPA 20% ( $0,01 \pm 0,00$  g/dL), em que esse valor mostrou-se elevado em 26,38% em relação ao grupo CN, aos 30 dias.

Após 90 dias, a concentração plasmática de globulina apresentou teores aproximados, com destaque para a redução da concentração no grupo FPA 5% ( $1,82 \pm 0,08$  g/dL) e FPA 10% ( $1,92 \pm 0,02$  g/dL) em relação ao grupo CN ( $2,14 \pm 0,06$  g/dL) (Gráfico 09).

**Gráfico 09.** Concentração plasmática de globulina (g/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).

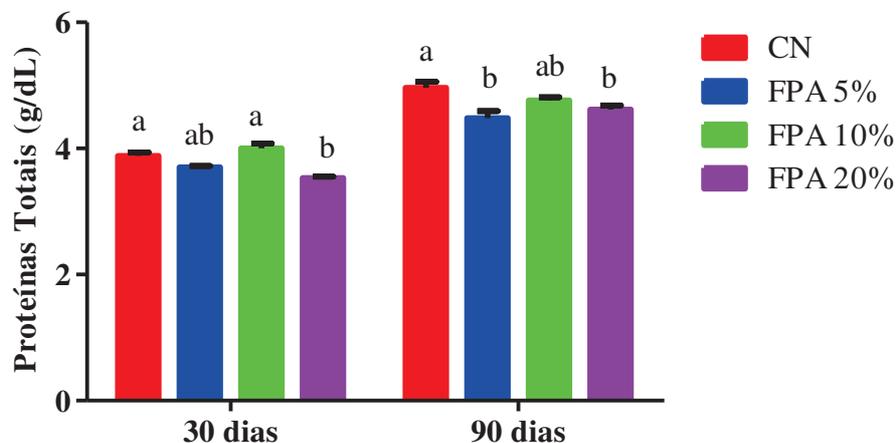


Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Na concentração plasmática de proteínas totais em 30 dias, o grupo FPA 20% ( $3,53 \pm 0,01$  g/dL) apresentou maior redução quando comparado ao grupo CN ( $3,88 \pm 0,05$  g/dL) e FPA 10% ( $4,00 \pm 0,07$  g/dL). Já o grupo FPA 10% ( $4,00 \pm 0,07$  g/dL) apresentou uma maior elevação nos seus valores diante do grupo FPA 20% ( $4,62 \pm 0,06$  g/dL).

Aos 90 dias, a concentração plasmática de proteínas totais apresentou redução nos grupos FPA 5% ( $4,48 \pm 0,11$  g/dL) e FPA 20% ( $4,62 \pm 0,06$  g/dL) em comparação ao grupo CN ( $4,96 \pm 0,09$  g/dL) (Gráfico 10)

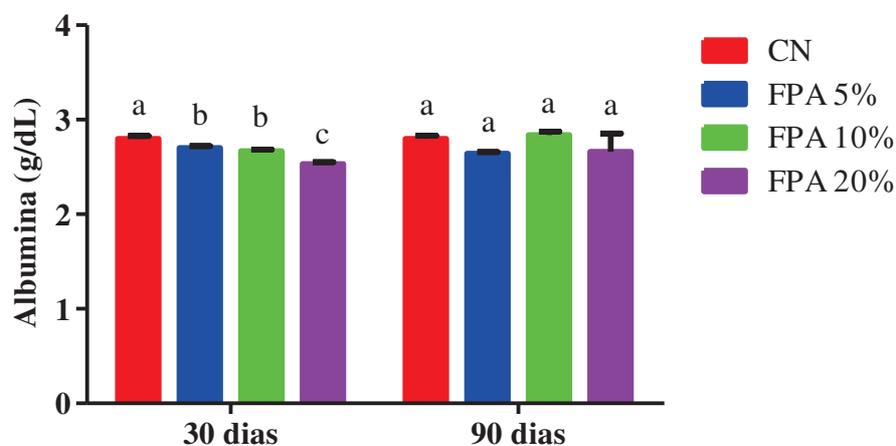
**Gráfico 10.** Concentração plasmática de proteínas totais (g/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

A concentração plasmática de albumina sofreu redução no grupo FPA 20% ( $2,53 \pm 0,01$  g/dL) quando comparado aos grupos CN ( $2,80 \pm 0,02$  g/dL), FPA 5% ( $2,70 \pm 0,02$  g/dL) e FPA 10% ( $2,66 \pm 0,01$  g/dL) no período de 30 dias. Após 90 dias, os grupos não apresentaram diferença significativa entre as suas médias (Gráfico 11).

**Gráfico 11.** Concentração plasmática de albumina (g/dL) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).

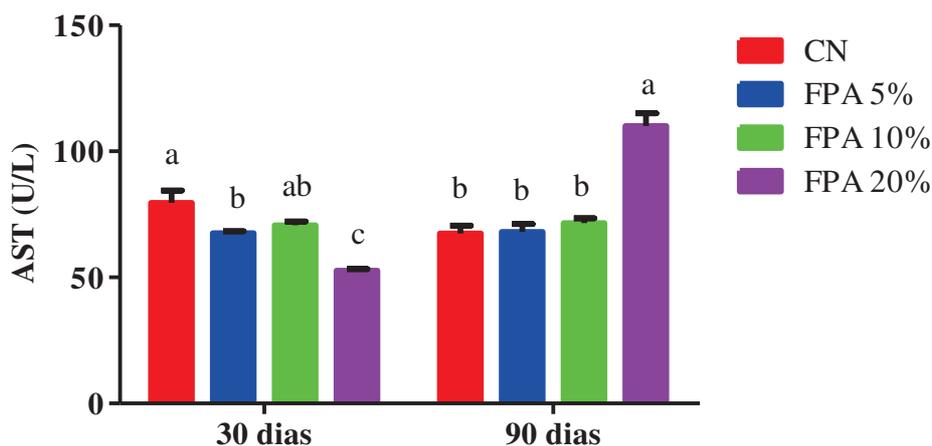


Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Para a concentração plasmática de AST aos 30 dias, os valores mostraram-se reduzidos no grupo experimental FPA 20% ( $52,67 \pm 0,62$  U/L) quando comparado aos grupos CN ( $79,60 \pm 4,87$  U/L), FPA 5% ( $67,50 \pm 0,75$  U/L) e FPA 10% ( $70,67 \pm 1,53$  U/L) sendo essa redução correspondente a 33,83% em comparação ao CN.

A concentração de AST apresentou valores elevados, após 90 dias, no grupo FPA 20% ( $110,00 \pm 5,11$  U/L) em comparação aos grupos CN ( $67,40 \pm 3,21$  U/L), FPA 5% ( $68,00 \pm 3,20$  U/L) e FPA 10% ( $71,60 \pm 1,79$  U/L), representando esse valor um aumento de 34,72% quando comparado ao grupo CN (Gráfico 12).

**Gráfico 12.** Concentração plasmática de AST (U/L) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).

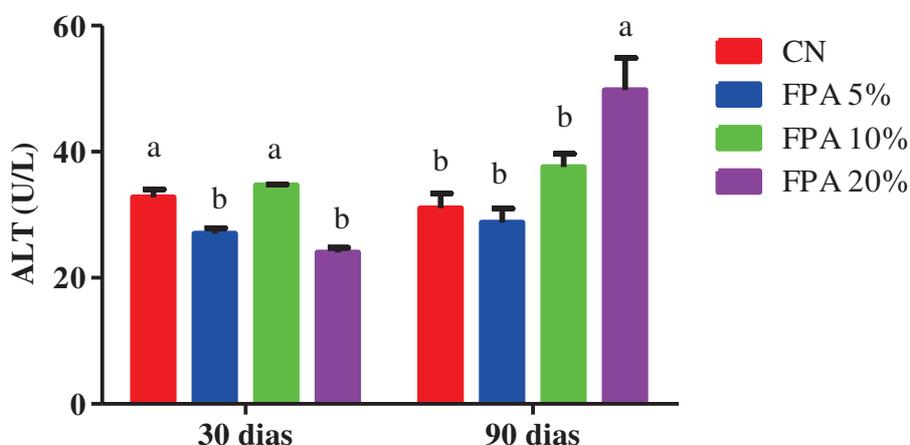


Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Para a concentração plasmática de ALT também aos 30 dias, os valores foram menores nos grupos FPA 5% ( $27,00 \pm 0,86$  U/L) e FPA 20% ( $24,00 \pm 0,78$  U/L) quando comparados ao grupo CN ( $32,80 \pm 1,21$  U/L) e o grupo FPA 10% ( $34,67 \pm 0,172$  U/L).

Já com relação à concentração plasmática de ALT em 90 dias, o analito apresentou valores elevados no grupo FPA 20% ( $49,80 \pm 5,06$  U/L) em comparação aos grupos CN ( $31,00 \pm 2,39$  U/L), FPA 5% ( $28,80 \pm 2,18$  U/L) e FPA 10% ( $37,60 \pm 2,05$  U/L), representando um aumento de 37,75% em relação ao CN (Gráfico 13).

**Gráfico 13.** Concentração plasmática de ALT (U/L) dos grupos experimentais tratados por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

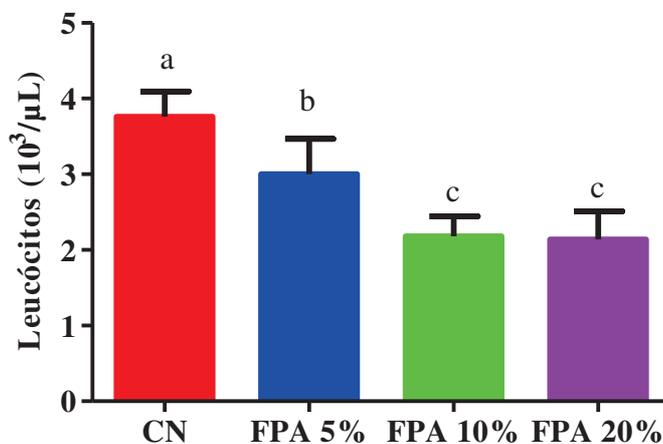
Os valores dos analitos das análises realizadas para glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina, globulina, proteínas totais, albumina, AST e ALT estão descritos nos Anexos 3 e 4.

## 7.6 Avaliação dos parâmetros hematológicos após 90 dias de tratamento

A análise do hemograma (leucócitos, número de hemácias, hemoglobina, hematócrito, VCM, CHCM e HCM) dos animais tratados com FPA, nas doses de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%) de inclusão na ração, durante o período experimental de 90 dias, apresentou algumas alterações hematológicas nos grupos tratados com FPA em relação aos animais cuja dieta continha apenas ração padrão (CN).

Houve diminuição no número de leucócitos nos grupos FPA 10% ( $2,18 \pm 0,12 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$ ) e FPA 20% ( $2,14 \pm 0,17 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$ ), em comparação aos grupos CN ( $3,76 \pm 0,15 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$ ) e FPA 5% ( $3,00 \pm 0,22 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$ ), em que foi observada uma redução de 42,02% e 43,08%, respectivamente, quando comparados com o grupo CN (Gráfico 14).

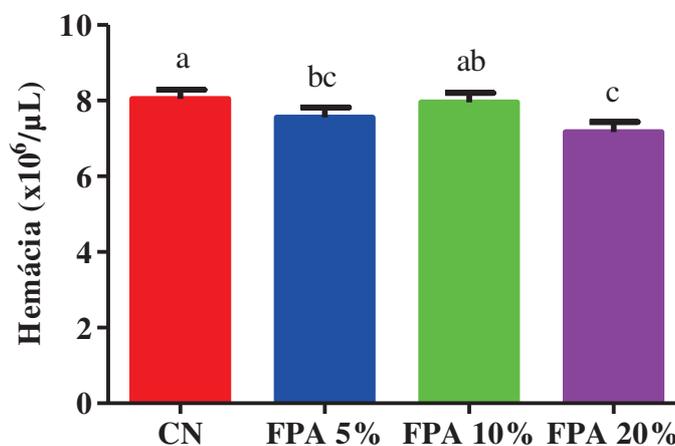
**Gráfico 14.** Concentração de leucócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P<0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

O número de hemácias sofreu redução no grupo FPA 20% ( $7,17 \pm 0,12 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) e FPA 5% ( $7,55 \pm 0,12 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) em comparação aos grupos CN ( $8,04 \pm 0,11 \times 10^6/\mu\text{L}$ ) embora os valores apresentados estejam próximos dos obtidos no grupo CN (Gráfico 15).

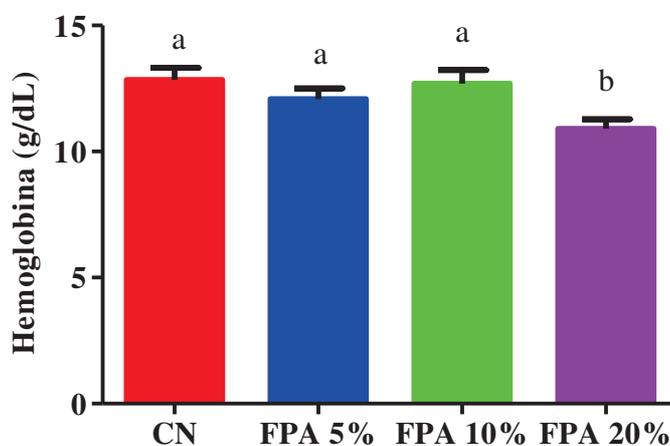
**Gráfico 15.** Número de hemácias ( $\times 10^6/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “<sup>a,b,c,d</sup>” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Já com relação à concentração plasmática de hemoglobina, verificou-se valores menores nos grupos FPA 20% ( $10,90 \pm 0,18$  g/dL) quando comparado aos grupos CN ( $12,84 \pm 0,22$  g/dL), FPA 5% ( $12,08 \pm 0,20$  g/dL) e FPA 10% ( $12,70 \pm 0,25$  g/dL), representando um valor de redução de 15,10% ao CN (Gráfico 16).

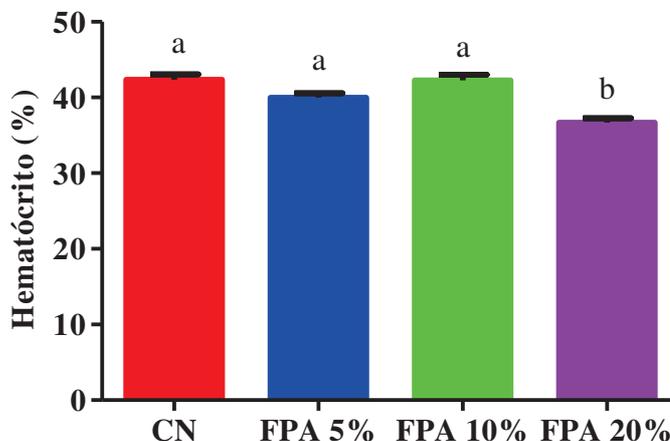
**Gráfico 16.** Concentração de hemoglobina plasmática (g/dL) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “<sup>a,b,c,d</sup>” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

O hematócrito apresentou valores menores no grupo FPA 20% ( $36,70 \pm 0,59$  %) em comparação aos grupos CN ( $42,36 \pm 0,71$  %), FPA 5% ( $39,98 \pm 0,57$  %) e FPA 10% ( $42,26 \pm 0,77$  %). A redução nesse grupo foi de 13,36% frente ao CN (Gráfico 17).

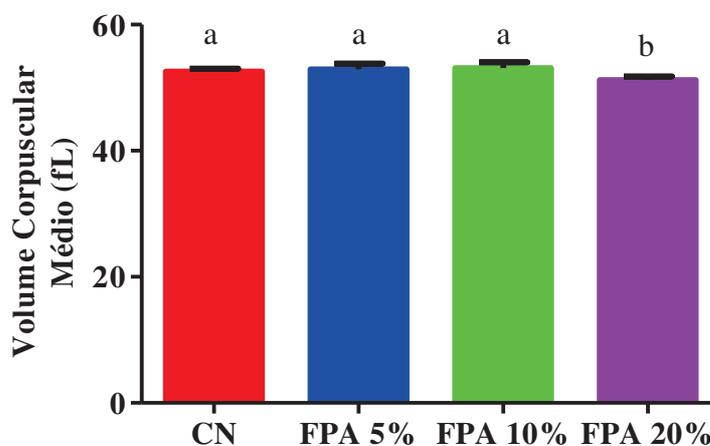
**Gráfico 17.** Valor de hematócrito (%) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

O volume corpuscular médio apresentou redução no grupo FPA 20% ( $51,22 \pm 0,26$  fL), em comparação aos grupos CN ( $52,60 \pm 0,21$  fL), FPA 5% ( $52,94 \pm 0,41$  fL) e FPA 10% ( $53,12 \pm 0,42$  fL) (Gráfico 18).

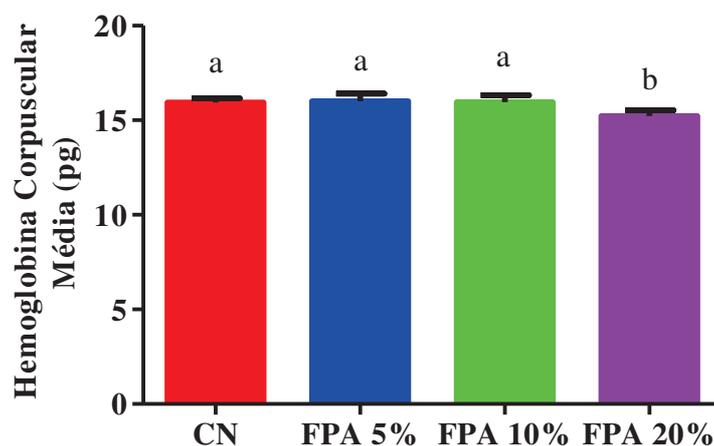
**Gráfico 18.** Volume corpuscular médio (fL) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

O teor de hemoglobina corpuscular média também foi menor no grupo FPA 20% ( $15,22 \pm 0,14$  pg) em comparação aos demais grupos CN ( $15,94 \pm 0,10$  pg), FPA 5% ( $16,00 \pm 0,19$  pg), FPA 10% ( $15,96 \pm 0,17$  pg) (Gráfico 19).

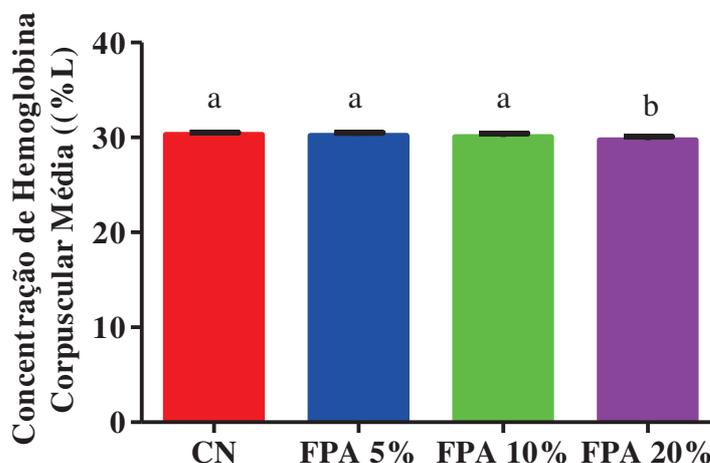
**Gráfico 19.** O teor de hemoglobina corpuscular média (pg) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

A concentração de hemoglobina corpuscular média apresentou valores menores, com diferença significativa do grupo FPA 20% ( $29,70 \pm 0,17$  %L) em relação ao grupo CN ( $30,30 \pm 0,09$  %L) (Gráfico 20).

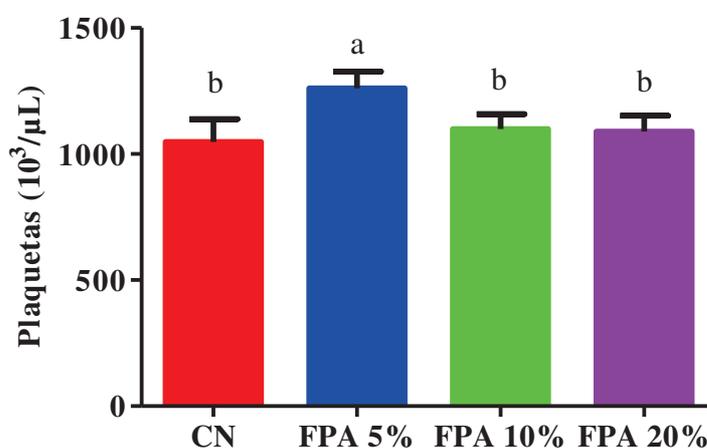
**Gráfico 20.** Concentração de hemoglobina corpuscular média (%L) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Já na plaquetometria foi observada uma elevação do número de plaquetas no grupo FPA 5% ( $1261 \pm 31,35 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$ ) em comparação aos grupos CN ( $1048 \pm 42,82 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$ ), FPA 10% ( $1099 \pm 27,77 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$ ) e FPA 20% ( $1089 \pm 29,43 \cdot 10^3 / \mu\text{L}$ ), com destaque para um aumento no valor desse parâmetro de 16,89%, em relação ao grupo CN (Gráfico 21).

**Gráfico 21.** Número de plaquetas ( $10^3 / \mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).

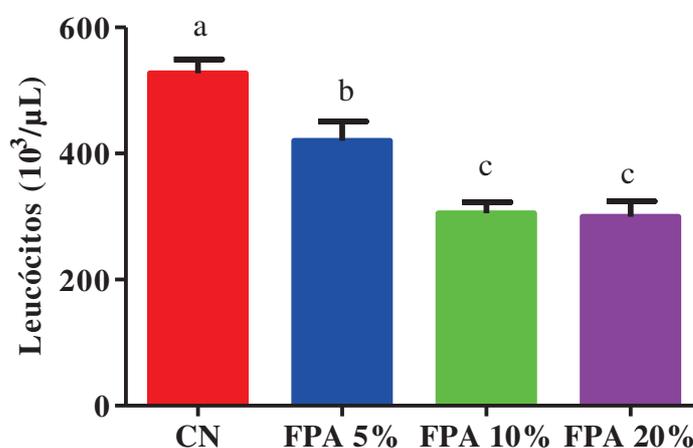


Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Na análise de contagem diferencial de células, foram observados os seguintes valores:

O número de leucócitos sofreu redução nos grupos FPA 10% ( $305,20 \pm 17,51 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ) e FPA 20% ( $299,60 \pm 24,57 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ), em comparação aos grupos CN ( $527,40 \pm 21,90 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ) e o grupo FPA 5% ( $420,00 \pm 30,88 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ), representando uma redução de 43,19% e 42,13%, respectivamente, frente ao CN (Gráfico 22).

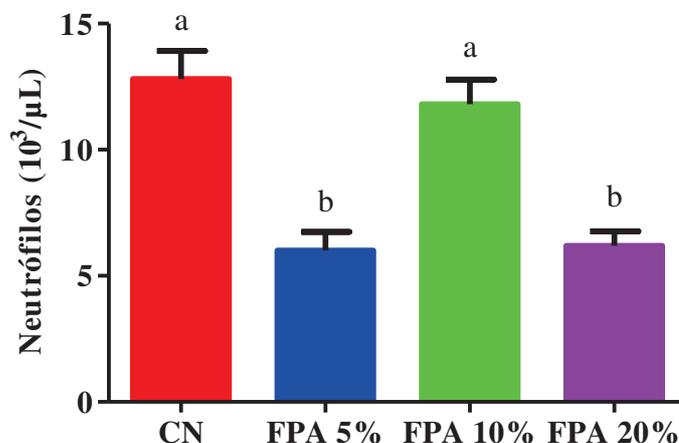
**Gráfico 22.** Número de leucócitos totais ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

O número de neutrófilos foi reduzido nos grupos FPA 5% ( $6,00 \pm 0,74 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ) e FPA 20% ( $6,20 \pm 0,56 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ), em comparação aos grupos CN ( $12,80 \pm 1,12 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ) e o grupo FPA 10% ( $11,80 \pm 0,98 \text{ } 10^3/\mu\text{L}$ ), representando um valor de redução de 53,12% e 51,56%, respectivamente, frente ao grupo CN (Gráfico 23).

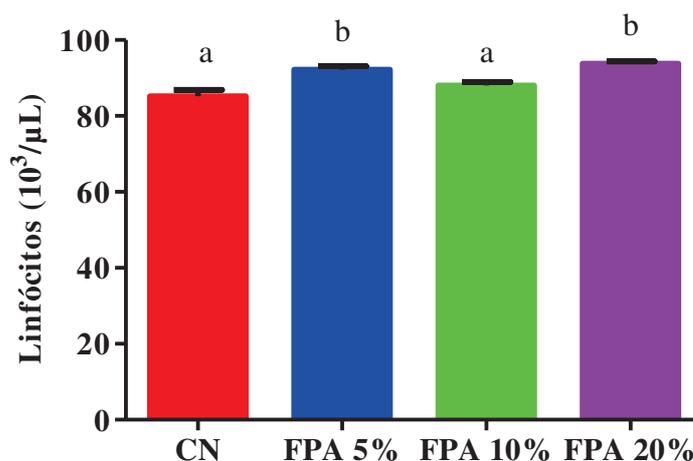
**Gráfico 23.** Número de neutrófilos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P<0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Já o número de linfócitos foi maior nos grupos FPA 5% ( $92,20 \pm 0,88 10^3/\mu\text{L}$ ) e FPA 20% ( $93,80 \pm 0,56 10^3/\mu\text{L}$ ), quando comparados aos grupos CN ( $85,20 \pm 1,64 10^3/\mu\text{L}$ ) e ao grupo FPA 10% ( $88,00 \pm 0,91 10^3/\mu\text{L}$ ) (Gráfico 24).

**Gráfico 24.** Número de linfócitos ( $10^3/\mu\text{L}$ ) dos grupos experimentais tratados por 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais ( $n=10$ ) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P<0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

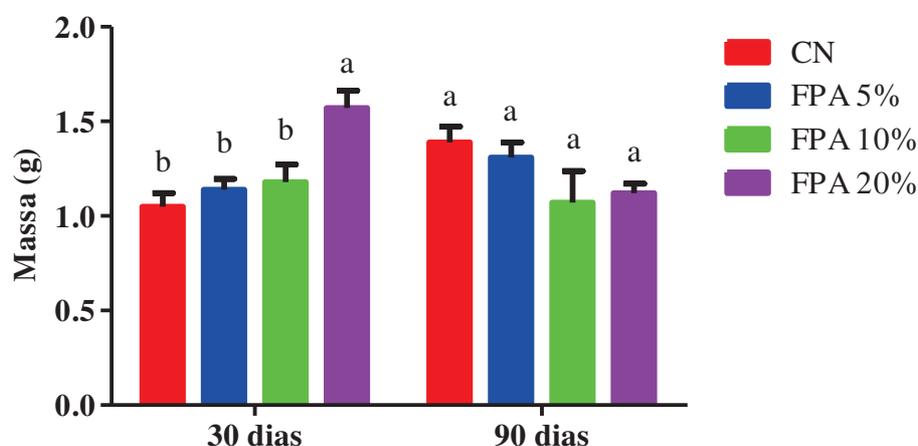
Os resultados dos analitos descritos acima estão discriminados no anexo 5.

### 7.7 Avaliação macroscópica e microscópica dos órgãos

Na avaliação macroscópica dos órgãos foram observadas mudanças na massa dos órgãos fígado, rins e coração com modificações no peso dos mesmos após tratamento dos animais com FPA nas doses de 5%, 10% e 20% de inclusão na dieta, durante os períodos de 30 e 90 dias do respectivo tratamento.

Para o período de 30 dias foi observado diferença significativa da massa do fígado, com destaque para um aumento no grupo FPA 20% ( $1,57 \pm 0,09$  g) quando comparado aos grupos CN ( $1,05 \pm 0,07$  g), FPA 5% ( $1,14 \pm 0,05$  g) e FPA 10% ( $1,18 \pm 0,09$  g), representando um aumento de massa de 32,59%, frente ao grupo CN. Já para o período de 90 dias de tratamento, não foram observadas diferenças significativas da massa do fígado entre os grupos (Gráfico 25).

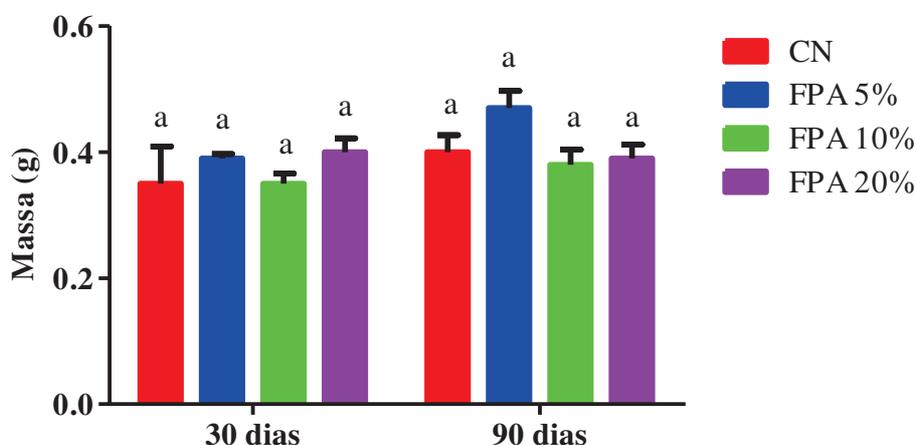
**Gráfico 25.** Massa absoluta do órgão fígado (g) dos camundongos após o tratamento por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde <sup>“a,b,c,d”</sup> representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

No período de 30 e 90 dias de tratamento dos grupos com os diferentes níveis de inclusão de FPA, não foram observadas diferenças significativa da massa dos rins entre os grupos estudados (Gráfico 26).

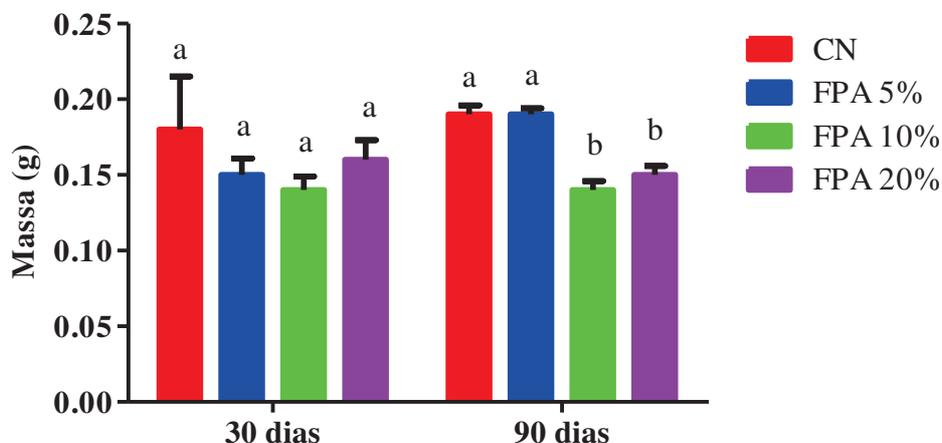
**Gráfico 26.** Massa absoluta do órgão rim (g) dos camundongos após o tratamento por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

No período de 30 dias de tratamento dos grupos com diferentes níveis de inclusão, não foram observadas diferença significativa da massa do coração entre os grupos estudados. Entretanto, no período de 90 dias foram observadas diferença significativa, em que os grupos FPA 10% ( $0,14 \pm 0,06$  g) e FPA 20% ( $0,15 \pm 0,06$  g) sofreram redução na massa do órgão quando comparados aos grupos FPA 5% ( $0,19 \pm 0,04$  g) e o grupo CN ( $0,19 \pm 0,06$  g), representando uma redução de 26,90% e 22,84%, respectivamente, quando comparados ao grupo com maior média de massa (Gráfico 27).

**Gráfico 27.** Massa absoluta do órgão coração (g) dos camundongos após o tratamento por 30 e 90 dias com ração padrão (CN) e ração padrão incorporada de farinha de folhas de *P. aculeata* (FPA) nas inclusões de 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% (FPA 20%).



Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), onde “a,b,c,d” representam  $P < 0,05$  entre os grupos experimentais, após a aplicação da ANOVA com pós teste de Tukey.

Os valores da massa dos órgãos estudados durante o período de 90 dias seguem descritos no Anexo 6 e 7.

Na análise microscópica para identificação histopatológica dos órgãos fígado, rins e coração, foram identificadas alterações no padrão histológico desses órgãos.

Na avaliação histopatológica do fígado de camundongos submetidos a uma dieta com níveis de inclusão de 5%, 10% e 20% de FPA durante o período de 30 e 90 dias, observou-se uma série de alterações, com destaque para áreas de degeneração, necrose, *focus* de hemorragia e áreas de arquitetura do órgão desorganizada (Tabela 05).

Na avaliação dos rins, observou-se com maior frequência discretas congestões vasculares e *focus* de hemorragia cortical nos grupos tratados com 10% de inclusão. Já os grupos tratados com 20% de inclusão, apresentaram além de *focus* de hemorragia cortical, degeneração tubular e aumento na concentração de células mesangiais (Tabela 06).

Por fim, a avaliação histopatológica do órgão coração apresentou *focus* de hemorragia durante os 30 primeiros dias nos níveis de inclusão de 10% e 20%, e durante o período de 90 dias foi possível observar hemorragia subepicárdica em todos os níveis estudados (Tabela 07).

De um modo geral, observou-se nos órgãos um aumento de alterações histológicas com o aumento do nível de inclusão da farinha de *P. aculeata* na ração de camundongos, e ainda com o aumento dos dias da utilização, ou seja, mais achados com 90 em relação aos 30 dias de utilização da ração.

Os achados de todos os órgãos seguem descritos nas Tabelas (05, 06 e 07) a seguir.

**Tabela 05.** Achados na análise histopatológica do fígado dos animais submetidos aos tratamentos com diferentes níveis de inclusão da farinha de folhas de *P. aculeata*.

<b>Órgão: Fígado</b>	
<b>30 dias</b>	<b>90 dias</b>
<b>FPA 5%</b>	<b>FPA 5%</b>
- Parênquima bem organizado com a presença de áreas de degeneração	- Presença de histiócitos - Áreas de degeneração - Áreas de necrose
<b>FPA 10%</b>	<b>FPA 10%</b>
- Áreas de degeneração - Discreta inflamação polimorfonuclear - <i>Focus</i> de hemorragia - Áreas com arquitetura desorganizada	- <i>Focus</i> de inflamação histocitária
<b>FPA 20%</b>	<b>FPA 20%</b>
- Degeneração hidrópica	- Áreas de degeneração - Inflamação histocitária

**Tabela 06.** Achados na análise histopatológica dos rins dos animais submetidos aos tratamentos com diferentes níveis de inclusão da farinha de folhas de *P. aculeata*.

<b>Órgão: Rim</b>	
<b>30 dias</b>	<b>90 dias</b>
<b>FPA 5%</b>	<b>FPA 5%</b>
- Córtex com túbulo contorcido proximal e distal – Nada digno de nota - Discreta congestão vascular	- Tecido bem preservado
<b>FPA 10%</b>	<b>FPA 10%</b>
- Discreta congestão - <i>Focus</i> de hemorragia cortical - Medula bem preservada	- Discreta congestão
<b>FPA 20%</b>	<b>FPA 20%</b>
- <i>Focus</i> de hemorragia cortical - Discreta degeneração tubular	- <i>Focus</i> de hemorragia - Proliferação de células mesangiais

**Tabela 07.** Achados na análise histopatológica do coração dos animais submetidos aos tratamentos com diferentes níveis de inclusão da farinha de folhas de *P. aculeata*.

<b>Órgão: Coração</b>	
<b>30 dias</b>	<b>90 dias</b>
<b>FPA 5%</b>	<b>FPA 5%</b>
- Sem observações pertinentes	- Hemorragia subepicárdica
<b>FPA 10%</b>	<b>FPA 10%</b>
- <i>Focus</i> de hemorragia do miocárdio	- Hemorragia subepicárdica
<b>FPA 20%</b>	<b>FPA 20%</b>
- <i>Focus</i> de hemorragia	- Hemorragia subepicárdica

## 8 DISCUSSÃO

Devido às quantidades significativas de proteínas e minerais, além de possuir folhas suculentas e comestíveis, a *P. aculeata* é considerada uma ótima alternativa para a suplementação e enriquecimento nutricional da dieta, sendo, portanto, muito utilizada no preparo de farinhas, saladas, refogados, tortas e massas alimentícias (ROCHA *et al.*, 2008).

Do ponto de vista científico, pesquisas têm demonstrado que muitos vegetais possuem substâncias deletérias, o que indica a necessidade de estudos relacionados aos seus possíveis efeitos tóxicos (BABAYI *et al.*, 2007).

Antes da realização dos ensaios de toxicidade, foram realizados ensaios para a determinação bromatológica na farinha das folhas de *P. aculeata* Miller, bem como a determinação da composição de nutrientes presentes nessa mesma amostra, para verificar possível influência do clima, solo, região do país no que se refere à composição nutricional da planta.

Com a realização da análise bromatológica, observou-se no presente estudo um teor de proteínas (13,04 g) por 100 g de massa seca nas folhas de *P. aculeata* Miller, mostrando-se esse valor abaixo dos valores citados na literatura (17,4 g: Almeida *et al.*, 1974; 22,9 g: Rocha *et al.*, 2008; 28,4 g: Takeiti *et al.*, 2009; 28,99 g: Almeida *et al.*, 2014) para essa mesma planta. Essa diferença no percentual menor de proteínas quando comparado a estudos anteriores pode ser em decorrência do solo da região e das condições climáticas.

São comuns na região do presente estudo solos do tipo franco-arenoso, os quais possuem uma quantidade relativamente baixa da fração argila. Essa propriedade influencia diretamente na fertilidade do solo, pois solos com maiores teores da fração areia tendem a possuir teores menores de matéria orgânica e nutrientes, principalmente pelo processo de lixiviação, além de reterem um teor menor de água, o que afeta a planta por meio do estresse hídrico.

A matéria orgânica tem papel fundamental no desenvolvimento das plantas, pois aumenta a tonalidade escura do solo, forma agregados que aumentam a permeabilidade ao ar, aumenta a capacidade de retenção de água, controla o pH, produz substâncias ativadoras e inibidoras do crescimento de microorganismo, além de influenciar na disponibilidade de macro e micronutrientes no solo (LUCHESE *et al.*, 2004).

Em pesquisa realizada por Mazia e Sartor (2012) acerca da influência do tipo de solo sobre o cultivo e na quantidade de proteínas das folhas de *P. aculeata*, observou-se que solos com teores maiores da fração areia (substrato contendo 60% de fração arenosa + 20% de terra

argilosa + 20% de matéria orgânica) influenciam de forma negativa na quantidade de proteínas nessa espécie de planta, apresentando essa planta valores médios de proteínas de 9,42%.

Embora o teor de proteínas tenha sido menor que outros casos citados anteriormente na literatura, quando comparamos o teor de proteína presente em 100 g da farinha de folhas de *P. aculeata* (13,04 g) com 100 g dos feijões da variedade carioca ou roxo (8,0 g e 6,9 g), respectivamente, tidos popularmente como uma das principais fontes de proteína (TACO, 2011), observa-se que a farinha desta espécie ainda que nas condições do semi-árido, apresenta maior teor proteico.

No que se refere à matéria mineral, o presente estudo apresentou valor significativo (14,04 g) e próximo ao dos estudos de Takeiti *et al.* (2009) - (16,1 g) e Almeida *et al.* (2014) - (14,81 g), os quais foram realizados em regiões com propriedades edafológicas mais propícias ao desenvolvimento fisiológico da espécie *P. aculeata* Miller.

Com relação aos valores de Extrato Etéreo ou lipídios, este estudo apresentou teor (4,29 g) maior do que o encontrado em trabalhos realizados por Rocha *et al.* (2008) (3,4 g) e Takeiti *et al.* (2009) (4,1 g), ainda assim, sendo considerado um valor baixo desse nutriente em vegetais. Em virtude dos baixos valores de lipídios, Rocha *et al.* (2008) sugerem que as folhas de *P. aculeata* podem ser utilizadas em dietas com restrição desse nutriente, sendo, portanto, importante, por exemplo, em dietas para finalidades dietéticas e hipocalóricas.

Os valores de Fibra em Detergente Neutro (FDN - 34,29 g) e Fibra em Detergente Ácido (FDA - 13,91 g) da farinha de *P. aculeata* foram maiores no presente estudo em comparação aos estudos de Takeiti *et al.* (2009) - (FDN - 33,9 g e FDA - 5,2 g) e Almeida *et al.* (2014) - (FDN - 19,17 g e FDA - 2,43 g), mostrando que a farinha de *P. aculeata* possui grandes quantidades de fibras solúveis e insolúveis na sua composição. Mahan (2002) afirma que a ingestão diária recomendada de fibras para um adulto deve ser de 2 g/Kg de peso corpóreo.

Desta forma, além da grande quantidade de proteína bruta, a *P. aculeata* é uma importante fonte para a ingestão de fibra. Isso é importante uma vez que se sabe que o consumo de fibras na dieta favorece o peristaltismo intestinal, além de prevenir várias doenças como: varizes (RICHARDSON; DIXON, 1977), câncer de cólon (HUANG *et al.*, 1978), hemorróidas, tumores intestinais (MENDELOFF, 1978), diabetes (MIRANDA; HORWITZ, 1978), além de reduzir a glicemia e o colesterol sanguíneos (KOHN, 1991; GLORE *et al.*, 1994).

Dentre os minerais contidos na farinha de *P. aculeata* foi observado nesse estudo valores menores de fósforo (170 mg), potássio (2.590 mg), magnésio (520 mg), zinco (3,12 mg) e manganês (14,14 mg), por 100 g de massa seca, quando comparados com o teor apresentado por Almeida *et al.* (2014) que encontraram: fósforo (320 mg), potássio (3.910 mg), magnésio (586, 67 mg), zinco (7,3 mg) e manganês (43,48 mg). Os outros valores de minerais encontrados nesse estudo foram superiores aos descritos pelo mesmo autor. Em comparação com as pesquisas de Takeiti *et al.* (2009) foram encontrados os seguintes dados: cálcio (3.420 mg), potássio (1.632 mg), magnésio (1.500 mg), fósforo (156 mg), manganês (46,40 mg), zinco (26,70 mg), ferro (14,18 mg) e cobre (1,40 mg). Em relação aos dois estudos, podemos destacar que com exceção do teor de potássio, fósforo, ferro e cobre, todos os outros valores encontrados no presente estudo foram inferiores aos descritos por Takeiti *et al.* (2009). Com relação aos níveis de fósforo (170,0 mg) e magnésio (520,0 mg), os valores encontrados nesse estudo também foram maiores do que os descritos por Almeida Filho e Cambraia (1974). A farinha das folhas de *P. aculeata* apresentou teores de ferro maiores que outros vegetais como: folhas de taioba com limbo com nervura (*Xanthosoma sagittifolium*) - 23,74 mg (PINTO *et al.*, 2001b), erva-de-ganso (*Parietaria debilis*) - 15,30 mg, chapéu-de-couro (*Echinodorus grandiflorus*) - 16,80 mg e urtiga-mansa (*Phenax uliginosus*) - 20,50 mg.

O teor de cálcio menor pode ser explicado em parte pela menor quantidade desse elemento no solo. Foi observado um teor de 39 milimol/dm<sup>3</sup> de cálcio para a amostra de solo avaliado, enquanto que o valor recomendado por Malavolta *et al.* (1997) está acima de 40 milimol/dm<sup>3</sup>.

Vale ressaltar que, mesmo apresentando valores menores de cálcio (2.710 mg), o teor observado deste mineral foi ainda superior ao presente nos iogurtes integral (143 mg) e desnatado (157 mg), leite de vaca desnatado UHT (134 mg) e integral (123 mg), e em vários tipos de queijos, brócolis, couve e espinafre, alimentos bastante tradicionais e consumidos diariamente pela população, segundo dados presentes na TACO (2011).

Já em relação ao teor de ferro, mesmo em valor inferior (24,34 mg) ao encontrado por outros autores na literatura, a quantidade encontrada no presente trabalho foi superior ao apresentado em alimentos tipicamente reconhecidos pelo alto teor desse nutriente e muito difundido pela população em geral, como o fígado bovino cru (5,6 mg) e grelhado (5,8 mg), beterraba crua (0,3 mg) e cozida (0,2 mg) (TACO, 2011).

Com relação aos ensaios de toxicidade, no primeiro estudo realizado para a determinação da DL<sub>50</sub>, nenhum animal foi a óbito mesmo após tratamento com a maior dose de farinha de *P. aculeata* (5000 mg/Kg), sendo a toxicidade oral aguda dessa substância

classificada na categoria 5, na qual a toxicidade aguda letal é superior a 5000 mg/Kg de acordo com o Sistema de Classificação Globalmente Harmonizado (Globally Harmonized Classification System) da OECD. Através dessa metodologia, pode-se inferir que a DL<sub>50</sub> de *P. aculeata* é superior a 5000 mg/kg.

Vale ressaltar que, no protocolo de OECD 425, apenas o Animal 1 tratado com uma dose de 175 mg/kg apresentou, durante os primeiros 30 min, uma leve taquicardia, piloereção e taquipneia, a qual desapareceu cerca de 1 h após a administração. Alguns autores afirmam que fatores como temperatura, luz, ventilação, umidade, qualidade do ar e manejo devem ser controlados o máximo possível, uma vez que isso pode influenciar no comportamento e bem estar dos animais. Considera-se que essas alterações possam ter sido influenciadas pelo manejo ou imobilização do animal, o que pode ter levado ao estresse em um curto período de tempo, uma vez que os outros animais apresentaram parâmetros comportamentais mais padronizados. Os demais animais avaliados no estudo apresentaram ausência de piloereção, taquicardia, taquipneia, tremores finos e grosseiros, movimentos circulares, exoftalmia, movimentos estereotipados, comportamento agressivo e restrição do consumo de água e ração, que pudessem estar ligados à ingestão da solução administrada aos animais (ANDERSEN, 2004; ANDRADE, 2006; TEIXEIRA, 2009; RIVERA, 2010).

Dentre os parâmetros que podem ser avaliados em estudos de toxicidade de suplementação de 30 e 90 dias, encontra-se a mensuração do ganho de massa corpórea e o consumo de ração e água do animal. A perda de peso e a diminuição do consumo de alimentos e água podem representar sinais de toxicidade, fato que não ocorreu neste estudo, uma vez que o grupo controle e os grupos tratados com diferentes níveis de inclusão de farinha de *P. aculeata* seguiram um padrão equivalente de ingestão de líquidos e sólidos, bem como ganharam massa corporal de forma contínua com o passar das 12 semanas de estudo.

Esses resultados divergem do estudo realizado por Dayrell e Vieira (1977) com ratos cuja dieta possuía concentrado de folhas de *P. aculeata*, durante 28 dias, e dos resultados obtidos por Almeida (2012), cujos animais foram alimentados com farinha de *Pereskia grandifolia* (FPG) em níveis de suplementação proteica de 5 e 10%, levando em ambos os estudos, a uma diminuição do peso corporal dos animais ao apresentarem diferença estatística entre os grupos estudados.

Entretanto, de acordo com estudo realizado por Carvalho *et al.* (2009) com grupos de animais alimentados com a farinha da alga marinha verde (*Ulva fasciata* Delile), que é rica em fibras, os mesmos apresentaram ganho de peso ao final de 30 dias, não diferindo do grupo controle alimentado com celulose como fonte de fibras. Também não foram observados nos

níveis de inclusão de *P. aculeata* na ração e nos períodos estudados, mudanças na pele, pelo, olhos, mucosas, respiração, aparecimento de tremores, convulsão, salivação, diarreia, letargia e coma.

O grupo de animais alimentados com suplementação proteica de 20% na ração apresentou numericamente um maior consumo de água e de ração, notadamente a partir do primeiro dia, em relação aos demais grupos experimentais, embora sem diferença estatística. Essa equivalência de consumo de ração entre os grupos, com uma tendência até de maior consumo com suplementação de *P. aculeata* 20% é um indicativo de ausência de toxicidade, uma vez que animais roedores podem reduzir a ingestão alimentar quando recebem uma dieta desbalanceada, com sabor desagradável e/ou com a presença de compostos tóxicos (BARDOCZ *et al.*, 1996).

No presente estudo, não foi correlacionado aumento do consumo de fibra com o ganho de peso. De modo geral, um dos efeitos das dietas ricas em fibras são o aumento da saciedade e a redução do apetite (EUFRÁSIO *et al.*, 2009). Todavia, Silva *et al.* (2003), trabalhando com ratos, não observaram diferença significativa na quantidade ingerida de dieta com diferentes tipos e concentrações de fibras.

Além dos parâmetros nutricionais, foram avaliados aspectos relacionados à propriedade antinutricional de *P. aculeata*. Para a amostra de FPA foi realizada análise para determinação de propriedade inibitória de tripsina e a quantidade de taninos totais. A FPA apresentou no presente estudo um percentual de 35% de atividade inibitória de tripsina, sendo 0,114 UI/mg<sup>-1</sup> de MS de unidade de inibição de proteínas. O valor encontrado é menor que os valores obtidos por Almeida *et al.* (2014) e por Silva *et al.* (2013), os quais também trabalharam com a farinha das folhas de *P. aculeata*, correspondendo a 1,82 UI/mg<sup>-1</sup> e 3,60 UI/mg<sup>-1</sup> de MS, respectivamente. Esses valores apresentados divergem dos estudos realizados por Dayrell e Vieira (1977), que não observaram a presença de unidades de inibição de tripsina para as amostras de folhas de *P. aculeata* Miller.

Traçando um paralelo da atividade inibitória de tripsina de outras espécies com alta concentração desse composto, como a soja crua, em relação a outras espécies convencionais e não-convencionais utilizadas na alimentação, observam-se valores que variam de 37,73 a 51,68 UI/mg<sup>-1</sup> de MS para a soja crua, para o feijão carioca (136,80 UI/mg<sup>-1</sup> de MS), em folhas de taioba (2,14 a 3,36 UI/mg<sup>-1</sup> de MS), farinha da semente de abóbora crua (0,88 a 6,24 UI/mg<sup>-1</sup> de MS) e abóbora torrada (0,43 a 3,38 UI/mg<sup>-1</sup> de MS), observando que o valor encontrado no presente estudo está bem abaixo dos valores observados nos alimentos citados (HAFEZ, 1983; ANTUNES *et al.*, 1995; PINTO *et al.*, 2001).

Assim, a FPA analisada no presente estudo apresentou atividade inibitória de tripsina inferior aos principais alimentos ricos nesse antinutriente, e em alguns exemplos de alimentos convencionais e outras hortaliças não-convencionais. Diante disso, como uma das principais funções dos inibidores de proteínas é provocar a interferência e redução da digestão de proteínas através da paralisação da ação da tripsina, a qual é a enzima responsável pela digestão das proteínas a presença dessas substâncias, ocasionam, a hipersecreção de enzimas digestivas, sendo isso causado justamente pela presença desses inibidores no trato digestivo, resultando também na baixa disponibilidade de aminoácidos essenciais livres (BAZOK *et al.*, 2005). Como já observado em outros estudos, a digestibilidade da *P. aculeata* está em torno de 85% (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010; MAZIA; SARTOR, 2012), não sofrendo esse valor influência de inibidores de tripsina. Em virtude da sua baixa concentração, o consumo de FPA parece ser seguro diante do ponto de vista nutricional, quando relacionado à presença de inibidores de tripsina.

Já com relação à presença de taninos na composição de *P. aculeata*, foram realizadas análises para sua determinação, em que se observou um teor de 0,40% de taninos totais. Em estudos realizados por Marquez e Lajolo (1990), os autores observaram uma baixa digestibilidade (62,8%) e excreção fecal de nitrogênio superior a 30% em estudos com ratos alimentados com feijão (*Phaseolus vulgaris*). Os autores atribuem esses resultados à ação de polifenóis, interação de fibras com a mucosa intestinal. Segundo Martin-Tanguy *et al.* (1977), taninos presentes em feijão-fava (*Vicia faba L.*) podem ser considerados como substâncias inibidoras de crescimento e responsáveis pela baixa digestibilidade de compostos nitrogenados. De acordo com os autores, os taninos podem afetar o crescimento de animais.

Quando comparado a estudos realizados por outros autores, Pinto *et al.* (2000) observaram que animais alimentados com rações isoenergéticas com valores de (0,0%; 0,21%; 0,42%; 0,63 e 0,84%) de teor de taninos influenciou de forma negativa, embora não tenha sido significativo estatisticamente, na digestibilidade de fibras e de proteínas para os dois níveis mais altos de concentração. Essa diminuição pode ser explicada, segundo Austin *et al.* (1989), pelo fato de que alguns aminoácidos têm grande afinidade pelos taninos, destacadamente a prolina, com os quais formam complexos resistentes ao ataque enzimático que ocorre durante o processo digestivo. Isso pode explicar o menor aproveitamento da proteína. Além disso, esses resultados corroboram com as afirmações de Chubb (1982), de que o tanino diminui o aproveitamento da proteína e leva a altas excreções de nitrogênio nas fezes. Entretanto, nesse mesmo estudo, a quantidade presente de taninos totais não foi suficiente para levar os animais a um quadro clínico tóxico. Pinto *et al.* (2004) afirmam que

níveis de 0,42% e 0,46%, respectivamente, de taninos totais na dieta, não afetaram a digestibilidade da matéria seca e proteína digestível.

Em estudo realizado por Almeida *et al* (2014), utilizando a farinha de *P. aculeata*, observou-se valores de até 19,34 mg/100 g de MS de taninos, sem apresentar influência significativa sobre a digestibilidade das proteínas. Segundo Hoseney *et al.* (1981), teores acima de 1,0 g/100 g de MS são considerados elevados e prejudiciais para a digestibilidade de proteínas. Portanto, seriam necessários aproximadamente 6 Kg de farinha de *P. aculeata* para causar diminuição da digestibilidade proteica.

Portanto, para as concentrações encontradas dos valores de tanino na farinha das folhas de *P. aculeata*, observa-se que a mesma não altera de forma significativa a digestibilidade de proteínas e fibras, sendo recomendado para a suplementação alimentar em virtude da grande quantidade desses nutrientes na sua composição.

Também foram avaliados aspectos relacionados ao metabolismo dos animais submetidos ao ensaio de toxicidade via oral com suplementação crônica após 30 e 90 dias da administração dos diferentes níveis de inclusão de farinha de *P. aculeata*. Os aspectos avaliados foram: glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina, globulina, proteínas totais, albumina, ALT e AST. Tais parâmetros bioquímicos são utilizados como indicadores do comportamento fisiológico do animal em resposta a alterações endógenas e também como biomarcadores de diagnósticos após a exposição a uma determinada substância. As alterações desses parâmetros podem suscitar sobre possíveis lesões em órgãos ou tecidos, além de identificar alterações que podem sugerir infecções (SHAHSAVANI, 2010). A determinação destes valores quando corretamente mensurados e interpretados, pode demonstrar precisamente as condições do animal no momento da amostragem, por meio do padrão nutricional, doenças ou estresse, bem como a qualidade do seu habitat (PÉREZ *et al*, 2003).

No modelo de toxicidade de suplementação de 30 e 90 dias, os animais que receberam as doses de 5 e 20% de inclusão de farinha nesse período, apresentaram redução nos níveis plasmáticos de glicose. A glicose é um parâmetro utilizado para avaliação do metabolismo dos carboidratos. Segundo Pereira (2007), as fibras contribuem para a queda do índice glicêmico dos alimentos, por meio de uma melhor resposta glicêmica e uma menor resposta insulínica. Observa-se que com a digestão lenta, a absorção se dá no decorrer de todo o intestino delgado, proporcionando uma curva de reação glicêmica, com um pico menor.

Além disso, modificações nos níveis séricos de glicose refletem mais no metabolismo geral, do que propriamente em sinais de toxicidade em um órgão específico (GILL *et al.*, 2010). Além disso, as fibras solúveis (FDA) apresentam efeitos benéficos na glicemia,

retardando a absorção de glicose, e no metabolismo de lipídios (GLORE, *et al*, 1994; SALGADO, 2001). Assim, sugere-se que a alta concentração de fibra, com destaque para o maior teor de fibra solúvel (13,91%), presente na planta estudada, possa ter contribuído para a redução dos níveis plasmáticos de glicose.

Os níveis de colesterol sofreram redução consideráveis durante os 90 dias do período experimental. Para esse parâmetro, o grupo FPA 20% apresentou redução quando comparado ao CN. O colesterol é importante para a formação e manutenção da função das membranas celulares, para a síntese de sais biliares, hormônios esteróides e da vitamina D. Entretanto, o colesterol em excesso é o principal fator associado a doenças cardiovasculares. As fibras presentes na dieta influenciam nas concentrações de colesterol, em que as fibras solúveis reduzem o tempo de trânsito intestinal e ajudam na diminuição das concentrações séricas de colesterol, ao passo que as fibras insolúveis aumentam a saciedade e auxiliam na redução da ingestão energética (MAHAN; ESCOTT-STUMP, 1998). Além disso, as fibras também auxiliam na redução dos níveis de colesterol através de outros mecanismos, tais como: a) atuam como agente sequestrador de ácidos biliares; b) reduzem as taxas de aumento da insulina pela redução da velocidade de absorção de carboidratos, retardando síntese de colesterol; e c) produzem ácidos graxos de cadeia curta, os quais são absorvidos pela circulação portal e inibem a síntese de colesterol (SBC, 1994; JONES; KUBOW, 2003).

Frias e Sgarbieri (1998) ao avaliarem ratos durante 28 dias recebendo dietas com 0%, 10% e 15% de fibras oriundas da goma guar, observaram que somente nas concentrações de 10% e 15% de fibra, houve efeito na redução do colesterol. Não apenas a concentração, mas também o tipo de fibra é importante na redução do colesterol.

Fietz e Salgado (1999) ao avaliarem, durante 30 dias, ratos alimentados com pectina e celulose nas concentrações de 5%, 10%, 15% e 20%, observaram que as dietas com celulose exerceram o menor efeito hipocolesterolemiantes quando comparadas com as dietas com pectina a 10% e a 15%. Já em outro estudo, não foi observada diferença estatística no nível de colesterol entre os ratos do grupo controle e aqueles que receberam a farinha da folha de mandioca a 5%, 10% e 15%, durante sete semanas, sendo que todos os grupos tinham 1% de colesterol e as mesmas quantidades de proteína digerível e fibras (MELO *et al*, 2007).

Desse modo, acredita-se que o alto teor de fibras de natureza solúvel no presente estudo, devido ao teor maior de pectina presente nessa fração, tenha contribuído para a redução sérica de colesterol, nos animais tratados com teores maiores de farinha de *P. aculeata*, por um período de 90 dias.

Outro parâmetro avaliado que sofreu redução significativa foi o nível plasmático de triglicerídeos. No período de 30 e 90 dias, os grupos FPA 20% e FPA 5% apresentaram redução nos valores desse parâmetro. As mesmas proposições feitas ao que foi relacionado à redução dos teores de glicose e colesterol se aplicam no presente parâmetro analisado, uma vez que as fibras formadoras de géis, característica observada na presente espécie, auxiliam na redução dos níveis séricos de colesterol e triglicerídeos em ratos e em humanos (HENRIQUES *et al.* 2008).

Além do mais, outro aspecto positivo do *P. aculeata* é a baixa quantidade de lipídios nas suas folhas, conforme pode ser observado nos estudos de Rocha *et al.* (2008) e Takeiti *et al.* (2009), os quais determinaram níveis de 3,64 e 4,1 g/100 g de MS, respectivamente. Fietz e Salgado (1999) também observaram redução significativa nas concentrações séricas de triglicerídeos de ratos submetidos a dietas com 10% e 15% de celulose e pectina, quando comparados àqueles do grupo controle. Assim, corroborando com as afirmações de Rocha *et al.* (2008), a *P. aculeata* pode ser utilizada em dietas com restrição de lipídios, devido ao seu baixo conteúdo deste nutriente.

A creatinina, ureia e ácido úrico são os principais produtos do catabolismo do músculo, proteína e metabolismo das purinas. Como esses compostos são excretados na urina, o quadro de disfunção renal está geralmente associado ao aumento da concentração plasmática dessas substâncias (MOTA, 2003). Dessa maneira, o aumento da creatinina e ureia sérica pode ser atribuído à diminuição da capacidade funcional de depuração dos rins (AFOLAYAN *et.al.*, 2009; ANIAGU *et.al.*, 2005).

Para os valores plasmáticos de ureia, foi observado redução em todos os grupos de 30 dias com diferentes níveis de inclusão de *P. aculeata*. Já no período de 90 dias, esses valores foram menores nos grupos FPA 5% e FPA 10%, sofrendo elevação no grupo FPA 20%, quando comparados ao CN. Uma dieta rica em proteínas provoca excesso de aminoácidos nos tecidos. Esse excesso de aminoácido é utilizado como fonte de energia e gliconeogênese, liberando ureia como produto nitrogenado proveniente do metabolismo das proteínas formada no fígado a partir da amônia (LIMA, 2003). O aumento dos níveis plasmáticos de ureia não desponta como bom indicativo da função renal (DANTAS *et al.*, 2006), dessa forma, os elevados níveis de ureia, principalmente no grupo FPA 20%, podem estar associados ao alto teor de proteína presente nessa espécie vegetal.

O teor de creatinina apresentou valores bastante elevados no grupo FPA 20% quando comparado ao CN e aos demais grupos no período de 90 dias. A creatinina é um produto metabólico da degradação da creatina-fosfato no músculo. A sua produção é

relativamente constante e depende da massa muscular. Valores aumentados de creatinina podem significar sobrecarga renal, insuficiência renal aguda ou, ainda, aumento no catabolismo proteico (VIJAYALAKSHMI *et al.*, 2000; ADEBAYO *et al.*, 2003). Por outro lado, a ingestão de dietas com grande quantidade de proteínas pode aumentar potencialmente o nível sérico de creatinina e diminuir a sua depuração (RAVEL, 1997). Esse fator pode explicar os valores elevados da creatinina plasmática dos animais do grupo FPA 20%, uma vez que a análise microscópica dos rins indicou que não houve alteração da massa normal e o mesmo apresentou tecido bem preservado.

Silveira (1988) descreve que a proteína total compreende todas as proteínas do sangue, incluindo a albumina e a globulina. As proteínas podem sofrer alterações de importância clínica, principalmente nos processos inflamatórios parasitários e metabólicos. A avaliação das proteínas totais é utilizada para verificar o estado nutricional e a formação de edemas, indicando alterações metabólicas e auxiliando no diagnóstico clínico de diversas enfermidades (KANEKO *et al.*, 1997). Alterações nos padrões da fração proteica não são características de uma doença em particular, mas podem trazer importantes informações diagnósticas, quando usadas em conjunto com outros achados clínicos e laboratoriais (FELDMAN *et al.*, 2000).

Dentre todas as proteínas encontradas em nosso organismo, a albumina desponta em relação às demais por ser a mais abundante (cerca de 50% do total) e, conseqüentemente, por ter um grande papel no equilíbrio e manutenção da pressão coloidosmótica entre o espaço intracelular e o líquido intersticial (BURTIS *et al.*, 2008). O teor de albumina foi menor no período de 30 dias para o grupo FPA 20%, entretanto, esse teor não apresentou diferença significativa entre os grupos nos períodos de 90 dias. Almeida (2012) observou teores maiores de albumina no grupo CN, quando comparado aos grupos cuja dieta continha 5 e 10% de farinha de *Pereskia grandifolia*, em animais alimentados durante 28 dias. Segundo o autor, tal achado pode estar relacionado à demanda de uma maior distribuição dos ácidos graxos livres, uma vez que a albumina é uma proteína sérica importante no metabolismo lipídico por atuar no transporte de ácidos graxos livres no sangue (DERIVI *et al.*, 1987), característica essa marcante no grupo CN por conter uma dieta com maior teor de lipídeos.

Para a concentração de proteínas totais, os valores no grupo FPA 10% se mostraram maiores que dos demais grupos aos 30 dias de fornecimento da *P. aculeata* na ração. Entretanto, durante os 90 dias, os valores observados para os grupos tratados com níveis de *P. aculeata*, foram próximos, porém menores que o CN nos níveis de 5 e 20%. Já o teor de globulina foi maior no grupo FPA 10% durante 30 dias, e todos os outros grupos

apresentaram valores menores aos 90 dias, com diferença significativa nos grupos FPA 5% e FPA 10%, quando comparados com o grupo CN. A diminuição das proteínas totais parece não envolver a albumina. Entretanto, parece envolver a globulina. Como os valores de albumina e proteínas totais foram alterados de forma significativa pela ingestão de *P. aculeata*, sugere-se que a função de síntese e secreção do fígado permaneceu alterada em alguns níveis de inclusão. Considerando o alto teor de proteína das dietas experimentais, se esperaria um aumento deste analito no soro dos animais. No entanto, isso não foi observado. Esse fenômeno pode estar relacionado ao aumento da frequência urinária, eliminando assim, mais ureia via renal.

A avaliação de parâmetros da função hepática é imprescindível para análise toxicológica de substâncias, uma vez que o fígado é o principal órgão metabolizador de substâncias no organismo (BRUNTON *et al.*, 2012). As aminotransferases, AST e ALT, são enzimas utilizadas como bons indicadores da função hepática e biomarcadores preditivos de uma possível toxicidade. No presente estudo, foi observado que houve redução nos teores de AST em alguns grupos estudados, quando comparados com o CN no período de 30 dias. Entretanto, para o período de 90 dias, o grupo com maior concentração de farinha de folhas de *P. aculeata* apresentou valores bastante elevados em relação aos demais grupos de níveis de inclusão e ao controle negativo. Já para as análises de ALT, se verificaram elevação significativa no grupo FPA 10%, quando comparado ao grupo CN no período de 30 dias. Já o valor desse analito durante o período de 90 dias foi maior no grupo FPA 20%, quando comparado ao grupo CN.

No estudo conduzido por Almeida (2012), ratos alimentados com farinha de *Pereskia grandifolia*, em níveis de 5 e 10% de inclusão, não apresentaram diferenças entre os grupos, quanto à atividade da enzima AST, todavia, o grupo 10% apresentou maior atividade sérica da enzima ALT, quando comparado ao grupo controle. A atividade da enzima ALT dos grupos alimentados com a farinha de *Pereskia grandifolia* ficou acima da concentração de referência dessa enzima para *Rattus norvegicus*, sugerindo assim, indícios de alterações na função hepática, pois as concentrações séricas de ALT aumentam quando ocorrem alterações na permeabilidade ou injúria nos hepatócitos (KANEKO *et al.*, 1997). Em outro estudo, animais alimentados com a farinha de folha de mandioca (5%, 10% e 15%) não apresentaram diferença estatística entre os diferentes grupos, mas foi observado um aumento da atividade sérica da enzima ALT, quando comparados com o grupo controle, não havendo alteração na atividade da enzima AST (MELO *et al.*, 1998). Os autores concluíram que, embora os

animais alimentados com a farinha de folhas de mandioca tenham apresentado lesões hepáticas, elas não foram suficientes para induzir o aumento da enzima AST.

Geralmente, um dano no parênquima hepático causa elevação de ambas às enzimas no sangue (LI *et al.*, 2011). Cerca de 80% da AST encontra-se localizada em mitocôndrias e aparece em altas concentrações em vários tecidos (fígado, rins, coração e pâncreas), enquanto a ALT é localizada principalmente no citosol dos hepatócitos, sendo considerada, portanto, um marcador mais sensível de dano hepatocelular do que a AST, podendo inclusive fornecer uma avaliação do grau de dano sofrido pelo fígado (MABEKU *et al.*, 2007). Dessa forma, observa-se, que a níveis hepáticos, a inclusão de 20% de farinha de *P. aculeata* pode apresentar danos a esse tecido durante um período de exposição crônica da planta.

O padrão fisiológico dos animais pode ser determinado por meio da avaliação sanguínea dos parâmetros hematológicos, bioquímicos e imunológicos (BORJESSON; CHRISTOPHER, 2000). Segundo Majerowicz (2005), as informações sobre a fisiologia de camundongos são essenciais, uma vez que testes hematológicos são capazes de determinar a existência de alguma doença. O conhecimento dos valores sanguíneos referentes aos parâmetros hematológicos possibilita a caracterização adequada do perfil sanguíneo de cada espécie (ALMEIDA *et al.*, 2008).

Portanto, o hemograma tem sido uma fonte de informação em estudos pré-clínicos toxicológicos (OLSON *et al.*, 2000), e pode ser dividido em eritrograma (células vermelhas), leucograma (células brancas) e plaquetograma (plaquetas).

Os índices hematimétricos VCM, HCM e CHCM, bem como o número de hemácias, quando em níveis normais, indicam a ausência de destruição das células vermelhas e de problemas na incorporação da hemoglobina, sendo este último achado sugestivo de ausência de anemia (ODEYEMI *et al.*, 2009). Houve uma redução nesses valores para o nível de maior concentração de FPA. Esse resultado pode ser interpretado como um indicativo de anemia e menor concentração de células vermelhas. Também houve uma ligeira redução dos níveis de hematócrito e hemoglobina. Adham *et al.* (2000) afirmam que essa redução é normal em animais que não receberam suplementação vitamínica de ácido ascórbico, podendo essa redução também ser um indicativo de anemia. Os mesmos autores afirmam que tal quadro pode estar relacionado à redução na absorção e redistribuição de Fe e, conseqüentemente, na síntese de hemoglobina.

Já o número de plaquetas foi mais elevado em todos os grupos, com destaque para o grupo FPA 5%. A diminuição no número absoluto de plaquetas ou o comprometimento da sua função podem causar distúrbios hemostáticos capazes de provocar

hemorragias, em que os principais sinais são: petéquias, equimoses, sufusões, sangramentos gastrintestinais e urinários. No presente estudo, não foram observadas reduções do número total de plaquetas dos grupos tratados com diferentes níveis de farinha de *P. aculeata*. Assim, pode-se sugerir que a planta não causa alterações hemostáticas, como hemorragias, ainda quando adicionada em níveis mais elevados (20%) na ração.

Na contagem diferencial de células no esfregaço sanguíneo, foi observado o número de leucócitos, neutrófilos e linfócitos. Verificou-se que o número de leucócitos e neutrófilos sofreu redução nos grupos FPA 5 e 20%, quando comparados ao CN. Já o número de linfócitos sofreu elevação nos grupos FPA 10 e 20% em relação ao grupo CN. O esfregaço sanguíneo na rotina hematológica permite a observação da morfologia celular e a detecção de alterações (CAMPBELL, 1994). O sistema hematopoiético constitui-se em um dos alvos mais sensíveis de toxinas, e é considerado um importante indicador do estado fisiológico ou patológico em humanos e animais (LI *et al.*, 2011). Indicações gerais de toxicidade da medula óssea são avaliadas através da análise de alterações do sangue periférico como a presença de anemias, neutropenias, trombocitopenias ou pancitopenias (EVAN, 2008). Além disso, a manutenção do número de neutrófilos e linfócitos é um forte indicador que não ocorreu processo inflamatório nem modificação no sistema imunológico (ASHAFA *et al.*, 2009; YAKUBU *et al.*, 2007).

Como ocorreram diferenças significativas na análise do sangue periférico, mais precisamente na redução no número de leucócitos e neutrófilos, sugere-se que a *P. aculeata* pode promover dano à medula óssea ou processo inflamatório, com a quebra da homeostase entre a quantidade de neutrófilos e linfócitos.

Na análise macroscópica dos órgãos, foi avaliada a massa do fígado, rins e coração. Dentre os períodos avaliados, ou seja, de 30 e 90 dias, houve diferença significativa entre a massa de alguns órgãos. Uma dieta possuindo compostos tóxicos pode levar a alterações no peso dos órgãos, na forma de aumento ou diminuição, podendo, portanto, ser um indicador sensível de toxicidade (BARDOCZ *et al.*, 1996; BABAYI *et al.*, 2007).

Fígado e rins são os principais órgãos investigados em animais utilizados em protocolos experimentais de toxicidade. No presente estudo, o fígado nos grupos em que foi utilizada a *P. aculeata* em diferentes níveis de inclusão na ração, apresentou aumento da massa no grupo FPA 20% nos primeiros 30 dias, entretanto, o mesmo, não sofreu alteração significativa da sua massa, quando comparados ao grupo controle negativo após 90 dias. Já os rins não apresentaram diferença significativa entre os grupos no período de estudo, e nem quando comparado entre os diferentes períodos de tempo. Para o período de 90 dias, o

coração apresentou para os grupos FPA 10% e FPA 20% uma redução de massa estatisticamente significativa.

O aumento da massa do fígado no grupo FPA 20% pode estar relacionado à degeneração hidrópica observado no tecido desse órgão. De forma geral, todos os tipos de lesão levam, em primeiro momento, ao acúmulo de água intracelular. Como consequência, a célula adota um aspecto edematoso, que corresponde ao aumento de água e sódio no citoplasma ou nas cisternas do retículo endoplasmático. Este fenômeno se deve à alteração da bomba de sódio-potássio produzido pela diminuição de adenosina trifosfato (ATP). A consequência direta é a retenção de sódio e água na célula, com grau mais intenso de edema (POZO; ARELLANO, 2006).

Em trabalho realizado por Almeida (2012), o autor relatou que animais alimentados com suplementação proteica de 5% e 10% de farinha de *Pereskia grandifolia* na dieta, apresentaram peso e tamanho do fígado menor numericamente em relação ao grupo CN, embora não tenha sido observada diferença estatística entre os grupos para esse parâmetro. O mesmo autor afirma que essa redução de massa está relacionada com uma menor concentração de gordura no fígado, em virtude de uma dieta mais rica em fibras e com menor teor de lipídios, características estas presentes na planta estudada no presente estudo. Já em outro estudo realizado por Anderson *et al.* (1994) foi observado diminuição do peso do fígado dos animais alimentados com goma guar (fonte de fibra), em relação àqueles alimentados com celulose. Essas afirmações podem corroborar com os dados obtidos no presente estudo, em que se observou redução numérica na massa do fígado durante o período experimental.

Análises microscópicas também foram realizadas no fígado, rins e coração. Especificamente com relação ao fígado, a utilização de diferentes níveis de *P. aculeata* no presente estudo levou a alterações hepáticas como desorganização da arquitetura do órgão, degeneração hidrópica, processo degenerativo de necrose e *focus* de inflamação e hemorragia, especialmente com o aumento dos níveis de inclusão da planta, e com a utilização mais prolongada da mesma. É dito que a insuficiência hepática, sinalizada pela elevação dos níveis de AST e ALT, pode ocasionar lesões difusas nesse órgão, com o comprometimento de 75% do parênquima hepático. Isso corrobora com os achados no presente estudo, em que juntamente com as alterações histológicas citadas anteriormente, foi verificado, especialmente com 90 dias, aumento nos níveis de AST e ALT, especialmente nas maiores concentrações de inclusão da planta na ração. Os principais sinais clínicos causados pela insuficiência hepática são icterícia, edema, hemorragias, fotossensibilização e

encefalopatia hepática (SANTOS *et al.*, 2008). Diferentemente do presente estudo, em trabalho realizado por Almeida (2012), com dieta suplementada com farinha de *Pereskia grandifolia*, a análise histopatológica do fígado mostrou normalidade na estrutura dos hepatócitos, sem infiltração inflamatória, necrose lobular central ou congestão da veia central e fibrose.

As alterações histopatológicas observadas nos rins foram discretas. A morfologia dos rins tratados com diferentes níveis de *P. aculeata* mostrou-se muito semelhante ao do grupo controle negativo. Foi observado nos rins da maioria dos animais que as regiões medular e cortical estavam bem conservadas dentro do padrão de normalidade. As principais lesões observadas nos rins foram congestão e hemorragia cortical, observadas nos grupos com maiores teores de inclusão de farinha de *P. aculeata*. Dessa forma, afirma-se que o aumento da creatinina, destacado anteriormente, não afetou de forma deletéria a estrutura fisiológica dos rins.

No caso do coração, as alterações histopatológicas observadas foram basicamente *focus* de hemorragia subepicárdica e do miocárdio. A estrutura histológica desse órgão encontrava-se dentro do padrão, sendo visualizado número reduzido de pequenos focos de hemorragia, provavelmente em função da homeostasia normal que visa à manutenção do equilíbrio do organismo (PEREIRA; BOGLIOLO, 2000).

## 9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do que foi exposto na apresentação dos dados e seus respectivos resultados, com relação à composição nutricional, o material analisado apresentou resultados relevantes para aos teores de proteína bruta, fibra em detergente neutro e cinzas. Além disso, as folhas de *P. aculeata* apresentaram teores de minerais bastante significativos, com destaque para os níveis de potássio, ferro e cálcio, que apresentaram teores maiores que aqueles encontrados em alimentos convencionais mais utilizados na dieta diária.

Com relação ao possível efeito nutricional, a análise do teor de inibidores de tripsina demonstrou que as folhas de *P. aculeata* apresentaram baixos teores desses inibidores, o que não comprometeu a digestibilidade das proteínas. O teor de taninos observado também foi bastante reduzido nas folhas de *P. aculeata*. Dessa forma, podemos destacar que essa atividade não se configura como um agente promotor de toxicidade ou de fatores antinutricionais.

A farinha de *P. aculeata* não apresentou efeitos tóxicos aos animais submetidos ao ensaio de *Up-and-Down* preconizados pela OECD 425, sendo determinada a  $DL_{50}$  acima de 5.000 mg/kg. Além disso, nesse mesmo ensaio, os animais não apresentaram alterações comportamentais que pudessem se caracterizar como um possível efeito ou resposta toxicológica, podendo ser recomendadas utilização das folhas de forma aguda.

A *P. aculeata* apresentou atividade hipolipidêmica, hipoglicêmica e redutora dos níveis séricos de colesterol, podendo ser indicada na dieta humana para a melhoria desses parâmetros biológicos.

Observou-se uma elevação nos teores de ureia e creatinina, entretanto, a elevação desses níveis não foi suficiente para que atuassem como promotores de insuficiência renal, uma vez que não houve alteração histopatológica nesse órgão. Além disso, a *P. aculeata* levou a elevados teores de AST e ALT nos animais, o que evidencia que, em um período de exposição crônica nos níveis apresentados, a presente espécie causa efeitos deletérios no fígado dos animais, em virtude também dos achados histopatológicos para esse órgão.

Com base nas análises hematológicas, a *P. aculeata* levou a redução moderada nos níveis hematimétricos, indicando que essa substância pode ocasionar uma anemia leve nos animais estudados.

Na avaliação histopatológica, o fígado apresentou diversas alterações teciduais, após um período maior de exposição a *P. aculeata*, podendo ser correlacionada com a elevação dos níveis das aminotranferases a níveis séricos.

Embora tenha apresentado alterações a níveis bioquímicos, hematológicos e histopatológicos, em período crônico, essas alterações não foram suficientes para levar os animais a um quadro clínico severo de sintomas ocasionados por efeitos tóxicos, ou até mesmo a óbito. Diante dos resultados, recomenda-se a utilização de *P. aculeata* em níveis menores que 20%, em dietas por períodos crônicos.

Tais dados são considerados relevantes, pois abrem perspectivas para o desenvolvimento de estratégias que utilizem a farinha de *P. aculeata* como fonte de proteína, fibras e minerais para utilização na alimentação humana e animal.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADEBAYO, J. O.; YAKUBU, M. T.; EGWIM, E. C.; OWOYELE, V. B.; ENAIBE, B. U. Effect of ethanolic extract of *Khaya senegalensis* on some biochemical parameters of rat kidney. **Journal of Ethnopharmacology**, v.88, p. 69-72, 2003.

ADHAM, K. G.; HASHEM, H. O.; ABU-SHABANA, M. B.; KAMEL, A. H. Vitamin C deficiency in the catfish *Clarias gariepinus*. **Aquaculture Nutrition**, v. 6, p. 129-139, 2000.

AFOLAYAN, A. J.; YAKUBU, M. T.; APPIDI, J. R.; MOSTAFA, M. Toxicological implications of aqueous extract of *Clematis brachiata* Thunb. leaves in male *Wistar* rats. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 3, p. 531-538, 2009.

AGHAALI, N.; GHADAMYARI, M.; HOSSEININAVEH, V.; RISEH, N. S. Protease inhibitor from the crude extract of plant seeds affects the digestive proteases in *Hyphantria cunea* (Lep.: Arctiidae). **Journal of Plant Protection Research**, v. 53, n. 4, p. 338-346, 2013.

ALMEIDA, F. J.; CAMBRAIA, J. Estudo do valor nutritivo do “Ora-pro-nóbis” (*Pereskia aculeata* Mill.). **Revista Ceres**, Viçosa, v. 21, n. 114, p. 105-111, 1974.

ALMEIDA, A. S.; FALEIROS, A.C.G.; TEIXEIRA, D. N. S.; COTA, U. A.; CHICA, J. E. L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongo. **Jornal Brasileiro de Patologia de Medicina Laboratorial**, Rio de Janeiro, v. 44, p. 429-432, 2008.

ALMEIDA, M. E. F.; CORRÊA, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 42, n. 4, p. 751-756, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000400029>.

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

ANDERSEN, M. L.; D’ALMEIDA V.; KO, G. M.; KAWAKAMI, R.; MARTINS, P. J. F. **Princípios éticos e práticos do uso de animais de experimentação**. São Paulo: UNIFESP – Universidade Federal de São Paulo, p. 166, 2004.

ANDERSON, J. W.; JONES, A. E.; RIDDEL-MASON, S. Ten different dietary fibers have significantly different effects on serum and liver lipids of cholesterol-fed rats. **J Nutr**, v. 124, p. 78-83, 1994.

ANDRADE, M. C. R. **A utilização de símios do gênero *Callithrix* como modelo experimental**. 2006. Disponível em: <<http://www.cobea.org.br/artigo4.htm>> Acesso em: nov. 2015.

ANIAGU, S. O.; NWINYL, F. C.; AKUMKA, D. D.; AJOKU, G. A.; DZARMA, S.; IZEBE, K. S.; DITSE, M.; NWANERI, P. E. C.; WAMBEBE, C.; GAMANIEL, K. Toxicity studies in rats fed nature cure bitters. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 72-78, 2005.

ANTUNES, P. L.; BILHALVA, A. B.; ELIAS, M. C.; SOARES, G. J. D. Valor nutricional de feijão (*Phaseolus vulgaris* L.), cultivares rico 23, carioca, pirata-1 e rosinha-g2. **Revista Brasileira de Agrociência**, v.1, 1995.

ANTUNES, A. F. **Atividade inibitória de extratos vegetais do cerrado sobre  $\alpha$ amilases**. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde). Programa de Pós Graduação em Ciências da Saúde, Universidade de Brasília, p. 96, 2008.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução Especial nº 90**, de 16 de março de 2004. Brasília: DOU de 18/03/2004.

ASHAFA, A. O. T.; YAKUBU, M. T.; GRIERSON, D. S.; AFOLAYAN, A. J. Toxicological evaluation of the aqueous extract of *Felicia muricata* Thunb. leaves in wistar rats. **African Journal of Biotechnology**, vol. 8, p. 949-954, 2009.

AUSTIN, P. J.; SUCHAR, L. A.; ROBBINS, C. T. Hagerman, A.E. Tannin binding proteins in saliva of deer and their absence in saliva of sheep and cattle. **J. Chem. Ecol.**, v. 15, p. 1335-1347, 1989.

BABAYI, H. M.; UDEME, J. J. I.; ABALAKA, J. A.; OKOGUN, J. I.; SALAWU, O. A.; AKUMKA, D. D.; ADAMU; ZARMA, S. S.; ADZU, B. B.; ABDULMUMUNI, S. S.; IBRAHIME, K.; ELISHA, B. B.; ZAKARIYS, S. S.; INYANG, U. S. Effect of Oral Administration of Aqueous Whole Extract of *Cassia Filiformis* on Haematograms and Plasma Biochemical Parameters in Rats. **Journal of Medical Toxicology**, v. 3, n. 4, 2007.

BARDOCZ, S.; GRANT, G.; PUSZTAI, A. The effect of phytohaemagglutinin on the growth, body composition, and plasma insulin of the rat at different dietary concentrations. **Br J Nutr.**, v. 76, p. 613-626, 1996.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C. Avaliação da toxicidade. In: OGA, S. (Ed.). **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Atheneu, p. 60-70, 1996.

BAZOK, R.; BARCIC, J. I.; EDWARDS, C. R. Effects of proteinase inhibitors on western corn rootworm life parameters. **Blackwell Verlag**, v. 129, p. 185-190, 2005.

BLÖSSNER, M.; DE ONIS, M. **Malnutrition: quantifying the health impact at national and local levels**, 2005. Disponível em: <[http://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/publications/MalnutritionEBD12.pdf](http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/MalnutritionEBD12.pdf)>. Acesso em: nov. 2015.

BORJESSON, D. L.; CHRISTOPHER, M. M. BOYCE, W. M. Biochemical and hematologic reference intervals for free-ranging desert bighorn sheep. **J. Wildl Dis.**, v. 36, n. 2, p. 294-300, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Alimentos regionais brasileiros**. Brasília, DF, 2002. 140 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais**. Brasília: MAPA, 2010. 92 p.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Hortaliças não-convencionais: (tradicionalis)** / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo. – Brasília: MAPA/ ACS, 2010. 52 p.

BROUNS, F.; SARIS, W.; HOOR, F. T. Nutrition as a factor I the prevention of injuries in recreational and competitive downhill skiing. **Journal of Sports Medicine**, Baltimore, v. 9, n. 4, p. 112-119, 1986.

BRUNTON, L. L.; CHABNER, B. A.; KNOLLMANN, B.C. **As Bases Farmacológicas da Terapêutica de Goodman e Gilman**. 12. ed. Rio de Janeiro: Mcgraw Hill, 2012.

BURTIS, C. A.; ASHWOOD, E. R.; BRUNS, D. E. **Tietz: Fundamentos de Química Clínica**. Rio de Janeiro. 6ª edição. Editora: Elsevier, p. 413-440, 2008.

CALDERON, L. A.; FILHO, H. A. A; TELES, R. C. L.; MEDRANO, F. J.; JR, C. B.; SANTORO, M. M.; FREITAS, S. M. Purification and structural stability of a trypsin inhibitor from Amazon Inga cylindrica [Vell.] Mart. seeds. **Brazilian Society of Plant Physiology**, v. 22, p.73-79, 2010.

CAMPBELL, T. W. Hematology In: RITCHIE, B. W.; HARRISON, G. J.; HARRISON L. R. Avian medicine: principles and application. Lake Worth: **Wingers Publishing**, p. 176-198, 1994.

CARVALHO, A. F. U.; PORTELA, M. C. C.; SOUSA, M. B.; MARTINS, F. S.; ROCHA, F. C.; FARIAS, D. F.; FEITOSA, J. P. A. Physiological and physico-chemical characterization of dietary fibre from the green seaweed *Ulva fasciata* Delile. **Braz J Biol.**, v. 69, p. 969-77, 2009.

CAZARIN, K. C. C.; CORREA, C. L.; ZAMBRONE, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 40, n. 3, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322004000300004>.

CHAVES, N. **Nutrição básica e aplicada**. Rio de Janeiro: Guanabara, 1985.

CHOUGULE, N. P.; HIVRALE, V. K.; CHHABDA, P. J.; GIRI, A. P.; KACHOLE, M. S. Differential inhibition of *Helicoverpa armigera* gut proteinases by proteinase inhibitors of pigeonpea (*Cajanus cajan*) and its wild relatives. **Phytochemistry**, v. 64, p. 661-667, 2003.

DANTAS, J. A.; AMBIEL, C. R.; CUMAN, R. K. N.; BARONI. S.; BERSANI, A.; CIOMAR, A. Valores de referência de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Paraná. **Acta Sci Health Sci.**, v. 28, p. 165-70, 2006.

DAYRELL, M. S.; VIEIRA, E. C. Leaf protein concentrate of the cactacea *Pereskia aculeata* Mill. I. Extraction and composition. **Nutrition Reports International**, v. 15, n. 5, p. 529-537, 1977.

DE ONIS, M.; BLOSSNER, M.; BORGHI, E; MORRIS, R.; FRONGILLO, E. A. Methodology for estimating regional and global trends of child malnutrition. **International Journal of Epidemiology**, v. 33, n. 6, p. 1260-1270, 2004. doi: 10.1093/ije/dyh202.

DERIVI, S. C. N, MENDEZ, M. H. M, RODRIGUES, M. C. R.; FERNANDES, M. L.; SILVA, M. F. Ação da fibra solúvel pectina sobre as concentrações glicêmicos, em ratos. **Rev Bras Farm.**, v. 68, p. 1-7, 1987.

DETMANN, E.; SOUZA, M. A.; VALADARES FILHO, S. C.; QUEIROZ, A. C.; BERCHIELLI, T. T.; SALIBA, E. O. S.; CABRAL, L. S.; PINA, D. S.; LADEIRA, M. M.; AZEVEDO, J. A. G. **Métodos para análise de alimentos - INCT - Ciência Animal**. Visconde do Rio Branco: Suprema, p. 214, 2012.

DUARTE, M. R.; HAYASHI, S. S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Miller (Cactácea). **Revista Brasileira de Farmocognosia**, João Pessoa, v. 15, n. 2, p. 103-109, 2005. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200006>.

DUARTE, M. S. L.; PEREIRA, C. A. S.; SOUZA, E. C. G.; CONCEIÇÃO, L. L. Determinação da atividade in vitro de inibidores de tripsina em feijão (*Phaseolus vulgaris* L.) preto, albumina e globulina. **Alimentos e nutrição**, v. 21, n.3, p. 373 – 376, 2010.

DUBOWITZ, V. Enzyme histochemistry of skeletal muscle. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, v. 28, p. 516-24, 1965.

EUFRÁSIO, M. R.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, R. V.; ABREU, W. C.; LIMA, M. A. C.; PEREIRA, M. C. A. Efeito de diferentes tipos de fibras sobre frações lipídicas do sangue e fígado de ratos wistar. **Ciênc Agrotec.**, v. 33, p. 1608-1614, 2009. doi: 10.1590/S1413-70542009000600021.

EVAN, G.O. **Animal hematotoxicology: a practical guide for toxicologists and biomedical researchers**. CRC Press, Boca Raton, 2008.

FAO – Food and Agriculture of the United Nations. **Climate Change and Hunger**, 2009. Disponível em: <http://cdm15738.contentdm.oclc.org/utis/getfile/collection/p15738coll2/id/17143/filename/17144.pdf> <. Acesso em: nov. 2015.

FAO – Food and Agriculture of the United Nations. **Biodiversity for a world without hunger**. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/biodiversity/components/plants/en>> Acesso em: nov. 2015.

FAO – Food and Agriculture of the United Nations. **Estado de segurança alimentar e nutricional no Brasil: um retrato multidimensional**, 2014. Disponível em: <[https://www.fao.org.br/download/SOFI\\_p.pdf](https://www.fao.org.br/download/SOFI_p.pdf)>c. Acesso em: nov. 2015.

FAO; IFAD; WFP. **The State of Food Insecurity in the World 2015**, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>> Acesso em: nov. 2015.

FELDMAN, B.C. et al. **Veterinary hematology**. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 5.ed, p. 1344, 2000.

FERREIRA, I. C. P. V.; MOTA, V. A.; ARAÚJO, A. V.; COSTA, C. A.; FERREIRA, M. A. J. F. Avaliação participativa de acessos de bucha vegetal. In: Congresso Latino Americano de Agroecologia. **Revista Brasileira de Agroecologia**, n. 4, p. 3155-3158, 2009.

FIALHO, E. T.; PINTO, H. Utilização de sorgo em rações para suínos e aves. **Circular Técnica Embrapa**, v. 16, p. 4-19, 1992

FIETZ, V. R.; SALGADO, J. M. Efeito da pectina e da celulose nas concentrações séricas de colesterol e triglicerídeos em ratos hiperlipidemicos. **Ciênc Tecnol Aliment.**, v. 19, p. 318-321, 1999. doi: 10.1590/S0101-20611999000300004

FONSECA, A. L. **A biologia das espécies *Daphnia leavis*, *Ceriodaphnia dubia silvestri* (Crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportameto destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais.** São Paulo, Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - UFSCAR, 1991.

FORBES, V. E.; FORBES, T. L. **Ecotoxicology in theory and practice.** Londres: Chapman and Hall, p. 247, 1994.

FRIAS, A. C. D.; SGARBIERI, V. C. Guar gum effects on food intake, blood serum lipids and glucose levels of Wistar rats. **Plant Foods Hum Nutr.**, v. 53, p. 15-28, 1998.

GAVA, A. J. **Princípios de tecnologia de alimentos.** São Paulo: Nobel, 7. ed., 2010.

GILL, S.; BONDY, G.; LEFEBVRE, D. E.; BECALSKI, A.; KAVANAGH, M.; HOU, Y.; TURCOTTE, A. M.; BARKER, M.; WELD, M.; VAVASOUR, E.; COOKE, G.M. Subchronic Oral Toxicity Study of Furan in Fischer-344 Rats. **Toxicol. Pathol.**, v. 38, p. 619-630, 2010.

GLIESSMAN, S. R. **Agroecologia: processos ecológicos em agricultura sustentável.** Porto Alegre: UFRGS, p. 653, 2005.

GLORE, S. R.; TREECK, D. V.; KNEHANS, A. W. Soluble fiber and serum lipids: a literature review. In: **J. Am. Diet. Assoc.**, v. 94, n. 4, p. 425-436, 1994

GUIMARÃES, C. A.; BRANDÃO, C. C. T.; COSER, L. R.; ALBUQUERQUE, Z. P.; SIU, C. E.; COITINHO, D. C. **Conclusões do Grupo de Trabalho Sobre “Alimentação Alternativa”**, Brasília: Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição/Organização Pan-Americana da Saúde, Fundo das Nações Unidas para a Infância, 1994.

HAFEZ, Y. S. Nutrient composition of different varieties and strains of soybean. **Nutr Rep Int**, v. 28, n. 3, p. 1197-1206, 1983.

HASSON, S.; BARNES, W. S. Effects of carbohydrate ingestion on exercise of varying intensity and duration. **Sports Medicine**, Auckland, v. 4, n. 2, p.110-201, 1989.

HENRIQUES, G. S.; SCORSIN, N. T.; CASSIM, A. L. O.; SIMEONE, M. L. F. Avaliação da influência dietética de uma ração à base de mix de fibras sobre a glicemia e o perfil metabólico de lipídios em ratos Wistar. **Rev. Med. Res.** v. 10, p. 58-66, 2008.

HOSENEY, R. C.; VARRIANO-MARSTON, E.; DENDY, D. A. V. Sorghum and millets. **Adv Cereal Sci Technol**, v. 4, p. 71-144, 1981.

HUANG, C. T. L. GOPALAKRISHNA, G. S.; NICHOLS, B. L. Fiber intestinal sterols and colon cancer. **American Journal Clinical Nutrition**, New York, n. 31, p. 516-526, 1978.

HUGHES, S.; KELLY, P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. **Parasite Immunology**, v. 28, n. 11, p. 577-588, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1111%2Fj.1365-3024.2006.00897.x>.

INSTITUTO CIDADANIA. **Projeto Fome Zero**. São Paulo: Instituto Cidadania, 2002. 3ª versão.

JEEJEEBHOY, K. N.; DETSKY, A. S.; BAKER, J. P. Assessment of nutritional status. **Journal of Parenteral and Enteral Nutrition**, v. 14, n. 5, p. 193-196, 1990. doi: 10.1177/014860719001400509.

JONES, P. J. H.; KUBOW, S. **Lipídios, esteróis e seus metabólitos**. In: Shils ME, Olson JA, Shike M, Ross AC. Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9ª ed. São Paulo: Manole; p. 83-84, 2003.

KANEKO, J. J.; HARVEY, J. W.; BRUSS, M. L. **Clinical biochemistry of domestic animals**. 5.ed. New York: Academic, 1997. p. 932.

KINUPP, V. F. Plantas alimentícias alternativas no Brasil, uma fonte complementar de alimento e renda. **Revista Brasileira de Agroecologia**, v. 1, n. 1, p. 333-336, 2006.

KINUPP, V. F.; BARROS, I. B. I. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na Região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 5, n. 1, p. 63-65, 2007.

KINUPP, V. F. Plantas Alimentícias Não-Convencionais (PANCs): uma Riqueza Negligenciada. **Anais da 61ª Reunião Anual da SBPC - Manaus**, 2009.

KOHN, I. J. The role of cholesterol in atherosclerosis and its potential management by dietary fiber. In: **Arq. Bras. Cardiol**, v. 56, n. 3, p. 173-184, 1991.

LI, X.; WANG, L.; LI, Y.; BAI, L.; XUE, M. Acute and subacute toxicological evaluation of scutellarin in rodents. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 60, p. 106-111, 2011.

LIMA, R. S. N. **Caminhando pela bioquímica**. 1º ed. Fortaleza, p. 138-143, 2003.

LUCHESE, A. V.; JUNIOR, A. C. G.; LUCHESE, E. B.; BRACCINI, M. C. L.. Emergência e absorção de cobre por plantas de milho (*zea mays*) em resposta ao tratamento de sementes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 34, n. 6, p. 1949 - 1952, 2004. doi:<http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782004000600044>

MABEKU, L.B.K.; BENG, V.P.; ESSAME, O.; ETOA, F.X. Toxicological evaluation of ethyl acetate extract of *Cylicodiscus gabunensis* stem bark (Mimosaceae). **Journal of Ethnopharmacology**, v. 111, n. 3, p. 598-606, 2007.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA Jr, V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química Nova**, São Paulo, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.

MDA - Ministério do Desenvolvimento Agrário. **Fome Zero: a experiência brasileira**, 2010. Disponível em: [http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user\\_arquivos\\_64/pageflip-4204234-487363-lt\\_Fome\\_Zero\\_\\_A\\_experinc-1750637.pdf](http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/pageflip-4204234-487363-lt_Fome_Zero__A_experinc-1750637.pdf). Acesso em: dez. 2015.

MDS – Ministério do Desenvolvimento Social e Combate a Fome. **O Brasil Sem Miséria**, 2014. Disponível em: [http://www.mds.gov.br/webarquivos/publicacao/brasil\\_sem\\_miseria/livro\\_o\\_brasil\\_sem\\_miseria/livro\\_obrasilsemmiseria.pdf](http://www.mds.gov.br/webarquivos/publicacao/brasil_sem_miseria/livro_o_brasil_sem_miseria/livro_obrasilsemmiseria.pdf). Acesso em: nov. 2015.

MADEIRA, N. R.; SILVEIRA, G. S. R. Ora-pro-nóbis. **Globo Rural**, São Paulo, n. 294, p. 100-101, 2010.

MAHAN, L. K.; ESCOTT-STUMP, S. **Alimentos, Nutrição e Dietoterapia** ed. 9. São Paulo: Roca, 1998.

MAHAN, L. K. **Krause: Alimentos, Nutrição & Dietoterapia**, 10<sup>o</sup> ed; São Paulo: Roca, p. 63-67, 2002.

MAJEROWICZ, J. **Boas práticas em biotério e biossegurança**. Rio de Janeiro: Interciência, 2008.

MAKKAR, H. P. S. Do tannins affect only protein utilisation? **Ind. Daryman**, v. 41, p. 135-156, 1988.

MALAFAIA, G. Efeitos das deficiências de ferro e zinco no sistema imune. **Revista da Pesquisa & Pós-Graduação**, v. 8, n. 2, p. 5-9, 2007.

MALAFAIA, G. Malnutrition and infection: a review. **Revista brasileira de nutriçãoclínica**, n. 5, p. 24-33, 2009.

MALAVOLTA, E.; VITTI, G. C.; OLIVEIRA, S. A. **Avaliação do estado nutricional das plantas: princípios e aplicações**. 2. ed. Piracicaba: Potafós, 1997. 319 p.

MARQUEZ, U. M. L.; LAJOLO, F. M. Nutritional value of cooked beans (*Phaseolus vulgaris*) and their isolated major protein fractions. **Journal of the Science of Food Agriculture**, Oxford, v. 53, n. 2, p. 235-242, 1990.

MARTIN-TANGUY, J.; GUILLAUME, J.; KOSSA, A. Condensed tannins in horse bean seeds: chemical structure and apparent effects on poultry. **Journal of the Science and Food Agriculture**, Oxford, v. 28, n. 8, p. 757-765, 1977.

MAZIA, R. S.; SARTOR, C. F. P. Influência do tipo de solo usado para o cultivo de *Pereskia aculeata* sobre propriedade proteica. **Revista Saúde e Pesquisa**, Maringá, v. 5, n. 1, p. 59-65, 2012.

MELO, D. S.; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a peroxidação lipídica, o perfil lipídico sanguíneo e o peso do fígado de ratos. **Ciênc Agrotec.**, v. 31, p. 420-428, 2007. doi: 10.1590/S1413-70542007000200023

MELO, D. S.; CORRÊA, A. D.; MARCOS, F. C. A.; SOUSA, R. V.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D. Efeitos da farinha de folhas de mandioca sobre a atividade das enzimas AST, ALT, FA e lipídios hepáticos de ratos *Wistar*. **Ciênc Tecnol Aliment.**, n. 2, v. 28, p. 32-37, 2008. doi: 10.1590/S0101-20612008000500006

MENDELOFF, A. J. Dietary fiber and gastrointestinal diseases. **Méd.Clin.Of N. Am.** n. 62, p. 165-172, 1978.

MÉNDEZ, M. C.; RIET-CORREA, F. Plantas Hepatotóxicas. In: RIET-CORREA, F.; SCHILD, A. L.; MENDEZ, M. D. C.; LEMOS, R. A. A. **Doenças de Ruminantes e Equinos**. São Paulo: Varela, v. 2, cap. 3, p. 219-227, 2001a.

MERCÊ, A. L.; LANDALUZE, J. S.; MANGRICH, A. S.; SZPOGANICZ, B.; SIERAKOWISKI, M. R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and  $Co^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Mn^{2+}$  e  $Ni^{2+}$ . **Bioresource Technology**, v. 76, n. 1, p. 29-37, 2001. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00078-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00078-X).

MIRANDA, P. M.; HORTWITZ, D. L. High fiber diets in the treatment of Diabets Mellitus. **Annals of Internal Medicine**, n. 88, p. 482-486, 1978.

MMA - Ministério do Meio Ambiente. **Biodiversidade Brasileira**, 2015. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira>. Acesso em: dez. 2015

MONTE, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular a nutrição infantil. **Jornal de pediatria**, Rio de Janeiro, v. 76, n. 3, p. 285-297, 2000.

MORAIS, A. R.; PEREIRA, G. I. S.; PEREIRA, R. G. F.; BARCELOS, M. F. P. Avaliação química da folha de cenoura visando ao seu aproveitamento na alimentação humana. **Ciência agrotécnica**, Lavras. v. 27, n. 4, p. 852-857, 2003. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-70542003000400017>.

MORAIS, T. M. F. **Estudo do potencial terapêutico hipolipidêmico e antiobesidade da tiramina em camundongos**. Fortaleza, Tese (Doutorado em Biotecnologia) – UFC, 2014.

MOTTA, V. T. **Bioquímica Clínica para Laboratório: Princípios e Interpretações**. 4ª ed. Porto Alegre: Editora Médica Missau; São Paulo: Robe Editorial, EDUCS - Caxias do Sul, 2003.

MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Hortaliças Não-convencionais**, 2010. 94p. Disponível em: [http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/vegetal/Qualidade/Qualidade%20dos%20Alimentos/manual%20hortali%C3%A7as\\_WEB\\_F.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Qualidade/Qualidade%20dos%20Alimentos/manual%20hortali%C3%A7as_WEB_F.pdf). Acesso em: dez. 2015.

MS – Ministério da Saúde. **Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar**, 2005. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/4274/AtendimentoDesnutricaoAtend.pdf?sequence=1>>. Acesso: nov. 2015.

MUELLER-HARVEY, I.; MCALLAN, A. B. Tannins: their biochemistry and nutritional properties. **Adv. Plant Cell Biochem. Biotechnol.**, v. 1, p. 151-217, 1992.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. Porto Alegre: Artmed, 6. ed. 2011.

NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)**. 4ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. 30-53. Disponível em: <[http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf?arquivo=taco\\_4\\_versao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf)>. Acesso em: jan. 2016.

OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development. **Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure**. 2001. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948378.pdf>>. Acesso: jan. 2016.

ODEYEMI, O. O.; YAKUBU, M. T.; MASIKA, P. J.; AFOLAYAN, A. J. Toxicological evaluation of the essential oil from *Mentha longifolia* L. subsp. *capensis* leaves in rats. **Journal of Medical Food**, v. 12, n. 3, p. 669 – 674, 2009.

OLSON, H.; BETTON, G.; ROBINSON, D.; THOMAS, K.; MONRO, A.; KOLAJA, G.; LILLY, P.; SANDERS, J.; SIPES, G.; BRACKEN, W.; DORATO, M.; DEUN, K.V.; SMITH, P.; BERGER, B.; HELLER, A. Concordance of toxicity of pharmaceuticals in humans and in animals. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 32, p. 56-57, 2000.

OLIVEIRA, F. L.; OLIVEIRA, A. S. B.; SCHMIDT, B.; AMANCIO, O. M. S. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. **Jornal de Pediatria**, Rio de Janeiro, v. 75, p. 350-356, 1999.

OLIVEIRA, I. M. V.; ANGELIS, R. C. Requisitos protéicos mínimos de diferentes fontes vegetais para ratos de laboratório em fase de crescimento. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**, v. 38, n. 1, p. 23-28, 2001. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962001000100004>.

ONU. General Assembly Resolution. **Declaration on the Right to Development 41/128**. New York, 1986.

ORTEGA-NIEBLAS, M.; MOLINA-FREANER, F.; ROBLES-BURGUENÑO, M.; R.; VÁZQUEZ-MORENO, L. Proximate composition, protein quality and oil composition in seeds of columnar cacti from the sonoran desert. **J Food Composition Analysis**, v. 14, n. 6, p. 575-84, 2001.

ORTIZ, L. T.; ALZUETA, C.; TREVIÑO, J.; CASTAÑO, M. Effects of faba bean tannins on the growth and histological structure of the intestinal tract and liver of chicks and rats. **British Poultry Science**, v. 35, n. 5, p. 743-754, 1994.

PADULOSI, S.; HODGKIN, T.; WILLIAMS, J. T.; HAG, N. **Underutilized crops: trends, challenges and opportunities in the 21st century**. Managing Plant genetic diversity. Rome. p. 323-338, 2002.

PARDE, V. D. **Inhibition of *Helicoverpa armigera* gut zymogen activation by plant protease inhibitors**. Thesis (Doctoral in Philosophy in Biochemistry). Department of Biochemistry, Babasaheb Ambedkar Marathwada University. 2009. 204 p.

PEREIRA, F. E. L.; BOGLIOLO, L. **Inflamações**. In: Brasileiro Filho, G.B. Patologia. 6ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 113-148.

PEREIRA, K. D. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. **Revista Cienc. Tecnol. ALiment.**, Campinas, v. 27, 2007.

PÉREZ, J. M.; GONZÁLEZ, F. J.; GRANADOS, J. E.; PÉREZ, M. C.; FANDOS, P.; SORIGUER, R. C. SERRANO, E. Hematologic and biochemical reference intervals for Spanish ibex. **J Wildl Dis.** n. 39, p. 209-215, 2003.

PINTO, N. A. V. D. **Avaliação das folhas, limbos e caules da taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott), visando seu aproveitamento na alimentação humana**. Lavras, Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – UFL, 1998.

PINTO, L.; PEZZATO, L.; MIRANDA, E.; BARROS, M.; FURUYA, W. Ação do tanino na digestibilidade de dietas pela tilápia-do-nylo (*Oreochromis niloticus*). **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 22, n. 3, p. 677-681, 2000.

PINTO, N. A. V. D. CARVALHO, V. D.; CORRÊA, A. D.; RIOS, A. O. Avaliação de fatores antinutricionais das folhas da taioba (*Xanthosoma sagittifolium* SCHOOT). **Ciênc Agrotec**, Lavras, v. 25, n. 3, p. 601-4, 2001a.

PINTO, N. A. V. D.; FERNADES, S.; THÉ, P.; CARVALHO, V. Variabilidade da composição centesimal, vitamina c, ferro e cálcio de partes da folha de taioba (*Xanthosoma sagittifolium* Schott). **Rev Bras Agrociência**, Pelotas, v.7, n. 3, p. 205-8, 2001b.

PINTO, L.; PEZZATO, L.; MIRANDA, E.; BARROS, M.; FURUYA, W. Efeito do tanino na digestibilidade dos nutrientes da ração pela tilápia-do-nylo, *Oreochromis niloticus*. **Acta Scientiarum. Animal Sciences**, v. 26, n. 2, p. 181-186, 2004.

POMPEU, D. G.; CARVALHO, A. S.; COSTA, O. F.; GALDINO, A. S.; GONÇALVES, D. B.; SILVA, J. A.; GRANJEIRO, P. A. Anti-nutritional factors and “*in vitro*” digestibility of leaves of *pereskia aculeata* Miller. **Biochemistry and Biotechnology Reports**, v.3, n.1, p. 1-9, 2014. doi: 10.5433/2316-5200.2014v3n1p1

POZO, S. D.; ARELLANO, J. L. P. **Manual de patologia general**. España, Elsevier, 2006.  
RAVEL, R.. **Laboratório clínico**. 6º ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p. 156 – 157, 1997.

RAWLINGS, N. D.; NARRETT, A. J.; BATEMAN, A. MEROPS: the database of proteolytic enzymes, their substrates and inhibitors. **Nucleic Acids Research**, v. 40, n.1, p. 343–350, 2012.

REDDY, N.; R., PIERSON, M. D.; SATHE, S. K.; SALUNKHE, D. K. Dry bean tannins: a review of nutritional implications. **Journal of the American Oil Chemist's Society**, Champaign, v. 62, n. 3, p. 541-549, 1985.

RICHARDSON, J. B.; DIXON, M. Varicene veins in tropical África. **The Lancet**, n. 9, p. 791-792, 1977.

RIVERA, E. A. B. **Bem-estar na experimentação animal**. In: Feijó AGS, Braga LMGM, Pitrez PMC. Animais na pesquisa e no ensino: aspectos éticos e técnicos. Porto Alegre: EdIPUCRS, p. 74-88, 2010.

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

ROSA, S. M.; SOUZA, L. A. Morfo – anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia Aculeata* Miller (Cactaceae). **Acta Scientiarum Biological Sciences**, Maringá, v. 2, n. 25, p. 415-428, 2003. doi: <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v25i2.2046>.

SALGADO, J. M.. **Como agem as Fibras**. In: Pharmacia de Alimentos: recomendações para prevenir e controlar doenças. 5 e.d. São Paulo: Madras. 2001. p. 99.

SANTOS, M. A. T. dos. Efeito do cozimento sobre alguns fatores antinutricionais em folhas de brócolis, couve-flor e couve. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 30, n. 2, p. 294-301, 2006.

SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMÕES, S. V. D.; BARROS, C. S. L. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras**, v. 28, p. 1-14, 2008.

SANTOS, I. C.; PEDROSA, M. W.; CARVALHO, O. C.; GUIMARÃES, C. D. C. SILVA, L. S. **Ora-pro-nóbis: da cerca à mesa**, Circular Técnica, n.177, 2012. Disponível em: <[http://www.epamig.br/index.php?option=com\\_docman&task=cat\\_view&gid=68&dir=DDES&order=date&limit=10&limitstart=50](http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=68&dir=DDES&order=date&limit=10&limitstart=50)> Acesso em: jan. 2016.

SBC - Sociedade Brasileira de Cardiologia. Consenso brasileiro sobre dislipidemia: detecção, avaliação e tratamento. **Arq Bras Cardiol**. 1994.

SHAHSAVANI, D.; KAZERANI, H. R.; KAVEH, S. Gholipour-Kanani H. Determination of some normal serum parameters in starry sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) during spring season. **Comp Clin Pathol.**, v. 19, p. 57-61, 2010.

SHERMAN, W. M.; COSTILL, D. L. The marathon: dietary manipulation to optimize performance. **American Journal of Sports Medicine**, Columbus, v. 24, n. 5, p. 200-215, 1984. doi: 10.1177/036354658401200107.

SILVA, M. R.; SILVA, M. A. A. P. Aspectos nutricionais de fitatos e taninos. **Revista de Nutrição**, v. 12, n. 1, p. 21-32, 1999.

SILVA, M. A. M.; BARCELOS, M. F. P.; SOUSA, R. V.; LIMA, H. M.; FALCO, I. R.; LIMA, A. L.; PEREIRA, M. C. A. Efeito das fibras dos farelos de trigo e aveia sobre o perfil lipídico no sangue de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar. **Ciênc Agrotec.**, v. 27, p. 1321-1329, 2003. doi: 10.1590/S1413-70542003000600017

SILVA, M. C.; PINTO, N. A. V. D. Teores de nutrientes nas folhas de taioba, ora-pro-nóbis, serralha e mostarda coletadas no município de Diamantina. In: fundação educacional do vale do Jequitinhonha, Diamantina, MG. **Anais**. Diamantina, p. 86. 2005.

SILVA, M. C.; PINTO, N. A. V. D. Teores de nutrientes nas folhas de taioba, ora-pro-nóbis, serralha e mostarda coletadas no município de Diamantina. In: **Anais da Fundação educacional do vale do Jequitinhonha**. Diamantina, p. 86, 2005.

SILVA, A. L.; SILVA, D. O.; CAMPESATO, C. Efeito da dieta contendo a planta *Pereskia aculeata*, Miller sobre o reflexo de animais em fase de crescimento. In: **Anais do XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil**. Bento Gonçalves, 2012.

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

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

SILVA JÚNIOR, A. A. da; NUNES, D. G.; BERTOLDI, F. C.; PALHANO, M. N.; KOMIEKIEWICZ, N. L. K. Pão de ora-pro-nóbis - um novo conceito de alimentação funcional. **Agropecuária Catarinense**, v. 23, n. 1, p. 35-37, 2010.

SILVA, M. R.; ROCHA, C. R.; SILVA, T. M.; SILVA, M. C. da; PAES, M. C. D.; PINTO, N. A. V. D. Caracterização química e antinutricional de farinhas de hortaliças não-convencionais. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v. 7, n. 3, p. 51-57, 2013.

SILVEIRA, J. M. **Interpretação dos resultados laboratoriais**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1988.

SIVAKUMAR, N.; LI, N.; TANG, J. W.; PATEL, B. K.; SWAMINATHAN, K. Crystal structure of AmyA lacks acidic surface and provide insights into protein stability at poly-extreme condition. **FEBS Letters**, v. 580, n.11, p. 2646-2652, 2006.

SOLOMON, M.; BELENGHI, B.; DELLEDONNE, M.; MENACHEN, E.; LEVINE, A. The involvement of cysteine protease and protease inhibitors genes in the regulation of programmed cell death in plants. **Plant Cell**, v. 11, n. 3, p. 431-443, 1999.

SOUZA, L. F.; SILVEIRA, C. S.; SILVEIRA, T. M. T.; BARROS, I. B. I. Produção de mudas de *Pereskia aculeata* Mill. (ora-pro-nóbis), utilizando diferentes doses de AIB. In: **Anais do Simpósio de Segurança Alimentar**. Gramado, 2012.

SOUZA, L. F. **Aspectos fitotécnicos, bromatológicos e componentes bioativos de *Pereskia aculeata*, *Pereskia grandifolia* e *Anredera cordifolia***. Porto Alegre, Tese

(Doutorado em Fitotecnia) - UFRGS, 2014.

SOUZA, T. C. L. **Perfil de compostos fenólicos extraídos de folhas de ora-pro-nóbis (*Pereskia Aculeata* Miller)**. Campinas, Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) - UNICAMP, 2014.

TAKEITI, C. Y.; ANTONIO, G. C.; MOTTA, E. M. P.; COLLARES-QUEIROZ, F. P.; PARK, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, n. 60, p. 148-160, 2009. doi: 10.1080/09637480802534509.

TAN, M. L.; SULAIMAN, S. L.; NAJIMUDDIN, N.; SAMIAN, M. R.; MUHAMMAD, T. S. T. Methanolic extract of *Pereskia bleo* (Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47- D cell line. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 96, n. 1, p. 287-294, 2005. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.025>.

TEIXEIRA, M. A.; FILHO, A. F. L. **Impacto dos fatores ambientais**. In: LAPCHIK, V. B. V.; MATTARAIA, V. G. M, KO, G. M. Cuidados e manejo de animais de laboratório. São Paulo: Atheneu, p.101-11, 2009.

TIFFIN, P.; GAUT, B. S. Molecular evolution of the wound-induced seine proteinase inhibitor wip1 in zea and related genera. **Molecular Biological Evolution**, v. 18, p. 2092-2101, 2001.

TOFANELLI, M. B. D.; RESENDE, S. G. Sistema de condução na produção de folhas de ora-pro-nóbis. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, Goiânia, v. 41, n. 3, p. 466-469, 2011.

TRUSSWELL, A. S. Protein versus energy in protein energy malnutrition. **South African Medical Journal**, n. 59, p. 753-756, 1981.

TURRA, A. F.; MARÇAL, F. J. B.; BARETTA, I. P.; TAKEMURA, O. S.; LAVERDE Jr, A. Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Pereskia grandifolia* Haworth (cactaceae). **Arquivos de Ciências da Saúde Unipar**, v. 11, n. 1, p. 9-14, 2007.

UNAIDS- Joint United Nations Program on HIV/AIDS. **UNAIDS Report on the global AIDS epidemic, 2010**. Disponível em: <[http://www.unaids.org/globalreport/Global\\_report.htm](http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm)>. Acesso em: nov. 2015.

UN – United Nations. **Declaration on the Right to Development** - 41/128, 1986. Disponível em: <<http://www.un.org/documents/ga/res/41/a41r128.htm>>. Acesso em: dez. 2015.

VALUEVA, T. A., REVINA, T. A., GVOZDEVA, E. L., GERASIMOVA, N. G., OZERETZKOVSKAYA, O. L. Role of Protease Inhibitors in Potato Protection. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v. 29, p. 444-448, 2003.

VAN SOEST, P.; J. **Nutritional ecology of the ruminants**. 2.ed. Ithaca: Cornell University Press, 1994. 476p.

VIJAYALAKSHMI, T.; MUTHULAKSHMI, V.; SACHDANANDAM, P. Toxic studies on biochemical parameters carried out in rats with serankottai nei, a siddha drug-milk extract of *Semecarpus anacardium* nut. **J Ethnopharmacol.** v. 69, n.1, p. 9-15, 2000.

WASTERNAK, C.; STENZEL, I.; HAUSE, B.; HAUSE, G.; KUTTER, C.; MAUCHER, H.; NEUMERKEL, J.; FEUSSNER, I.; MIERSCH. The wound response in tomato – Role of jasmonic acid. **Journal of Plant Physiology**, v.163, p. 297-306, 2006.

WATERLOW, J. C.; WEISZ, J. The fat protein and nucleic acid of liver in malnourished human infant. **The Journal of Clinical Investigation**, n. 35, p. 346-354, 1956. doi: <http://dx.doi.org/10.1172%2FJCI103284>.

WHO - World Health Organization. **Malnutrition. Quantifying the health impact at national and local levels**, 2005. Disponível em: [http://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/publications/MalnutritionEBD12.pdf](http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/MalnutritionEBD12.pdf). Acesso em: nov. 2015.

WILLIAMS, C. D. A nutritional disease of childhood associated with a maize diet. **Archives of Disease in Childhood**, v. 8, n. 48, p. 423-433, 1933.

WITTSTOCK, U., GERSHENZON, J. Constitutive plant toxins and their role in defense against herbivores and pathogens. **Current Opinion in Plant Biology**, v. 5, p. 1369-1377, 2002.

WORLD BANK. **Agricultura familiar, prioridade contra a fome na América Latina, 2016**. Disponível em: <<http://www.worldbank.org/pt/news/feature/2016/06/27/agricultura-familiar-punta-lanza-contr-hambre-america-latina>>. Acesso em: mar. 2016.

YAKUBU M. T.; AKANJI M. A.; OLADIJI A. T. Hematological evaluation in male albino rats following chronic administration of aqueous extract of *Fadogia agrestis* stem. **Pharmacog. Mag.**, v. 3, p. 34–38, 2007.

ZAPPI, D.; TAYLOR, N.; MACHADO, M. **Lista de espécies flora do Brasil, 2012**. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB001633>>. Acesso em: dez. 2015.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Artigo de revisão submetido à Revista Desenvolvimento e Meio Ambiente.

### **IMPORTÂNCIA DAS HORTALIÇAS NÃO CONVENCIONAIS COMO FONTE ALIMENTAR PROTEICA: ENFOQUE NA *PERESKIA ACULETA* MILLER**

#### **Resumo**

Diante da grande biodiversidade brasileira e da utilização de inúmeras espécies vegetais pela população, surge a perspectiva de aproveitamento da potencialidade de algumas espécies para fins alimentícios, com destaque para as hortaliças não convencionais, por possuírem grande quantidade de nutrientes. As classes mais carentes da sociedade tendem a recorrer ao emprego desses vegetais com mais frequência, devido ao seu menor poder aquisitivo e restrito acesso a outras fontes de proteína. Durante vários anos, organizações nacionais e internacionais utilizam-se dos recursos naturais para compor estratégias de segurança alimentar e nutricional no combate à fome e desnutrição de populações mais carentes. Devido ao seu alto teor de proteína e à presença de outros nutrientes importantes para o desenvolvimento pleno do organismo, as plantas do gênero *Pereskia* vêm sendo utilizadas como suplementos alimentares em varias regiões do Brasil. Entretanto, há relatos de que à ingestão de algumas espécies vegetais podem resultar na intoxicação ou no surgimento de alterações metabólicas. Assim, faz-se necessário o avanço em pesquisas sobre as propriedades tóxicas e antinutricionais de espécies nativas e os seus efeitos no organismo humano.

**Palavras chaves:** segurança alimentar, *Pereskia aculeata* Miller, efeitos tóxicos, suplemento proteico

#### **Abstract**

*Due to large Brazilian biodiversity and the use of numerous plant species by the population, arises the prospect of harnessing potential of some species for food purposes, especially for unconventional vegetables, for possessing a large amount of nutrients. The poorest classes of society tend to use these vegetables more often, due to their lower purchasing power and limited access to other sources of protein. For several years, national and international organizations are using natural resources to compose food security and nutritional strategies in the fight against hunger and malnutrition of needy populations. Due to its high protein content and the presence of other important nutrients for the full development of the organism, the plants of the genus *Pereskia* have been utilized as food supplements in various regions of Brazil. However, there are reports that the ingestion of some plant species can result in occurrence poisoning or the of metabolic changes. Thus, the advancement of research it is necessary for the toxic and antinutritional properties of native species and their effects on the human organism.*

**Keywords:** food security, *Pereskia aculeata* Miller, toxic effects, protein supplementation

## 1. Introdução

O Brasil é considerado o país com a maior diversidade biológica do planeta, com pouco mais de 20% da biodiversidade mundial, onde há cerca de 43.020 espécies vegetais possuindo as mais diversas propriedades. Esta vasta biodiversidade de vegetais se notabiliza por possuir diversas propriedades, com destaque para a grande quantidade de nutrientes, como por exemplo, proteínas e minerais (MMA, 2015). Entretanto, ao mesmo tempo em que existe uma grande diversidade de vegetais com potencial alimentício na flora brasileira, muito desse potencial é ainda subutilizado pelas populações, por serem consideradas plantas invasoras ou daninhas. Diante desse conhecimento limitado, como uma das consequências, a pequena participação da biodiversidade brasileira na matriz agrícola nacional e na produção regional de alimentos (KINUPP; BARROS, 2007).

Com o avanço tecnológico da agricultura, a indústria de alimentos passou a priorizar a utilização de culturas de maior importância econômica, em detrimento de um grande número de espécies que podem servir como complemento alimentar para a população (SOUZA, 2014). Segundo dados da Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO, 95% dos componentes da alimentação humana provém de 30 espécies de plantas, sendo o arroz, milho, trigo e batata, responsáveis por contribuir com 60% da demanda alimentar mundial (FAO, 2010).

Dessa forma, em virtude do acesso restrito por parte de algumas populações às espécies convencionais mais utilizadas na dieta, seja por gargalos financeiros, comerciais ou geográficos, à preservação e a utilização racional dos recursos fitogenéticos nativos e locais de comunidades agrícolas de todo o mundo, em especial dos países subdesenvolvidos, é necessária para a manutenção e garantia de segurança alimentar dessas populações, além de terem como garantida a obtenção de alimentos de forma racional e sustentável (FAO, 2015).

Dentre os principais grupos de plantas utilizados na alimentação humana, pode-se destacar as Hortaliças não-convencionais. Conceitualmente, são definidas como aquelas presentes em determinadas localidades ou regiões, exercendo influência na alimentação de uma população tradicional. São caracterizadas pelo seu excelente valor nutricional, fácil cultivo e baixo custo. Normalmente, não estão inseridas dentro de cadeia produtiva como as hortaliças domésticas convencionais. São também classificadas como alimentos reguladores ou protetores, por serem ricas em vitaminas, sais minerais e fibras, importantes para regulação das funções do corpo e proteção contra vários tipos de doenças. Além disso, possuem algumas características benéficas como: são leves e de fácil digestão; auxiliam na saciedade; fornecem poucas calorias e contêm carboidratos e água, nutrientes importantes

para o bom funcionamento do organismo (PINTO, 1998; ROCHA *et al.*, 2008; MAPA, 2010).

Devido ao seu baixo custo, fácil disponibilidade e valor nutritivo, esses alimentos podem ser uma alternativa para a melhoria de alguns nutrientes na dieta de pessoas de pouco poder aquisitivo, substituindo alimentos de alto custo. Também são importantes para diversificação da dieta, melhorando a qualidade nutricional e proporcionando um estado de segurança alimentar (MAPA, 2010).

Dentre às Hortaliças não-convencionais, destaca-se a *Pereskia aculeata* Miller, mais conhecida como Ora-pro-nóbis. Essa espécie é considerada um excelente complemento alimentar, em virtude dos elevados valores de proteína, fibras, cálcio e ferro, sendo muito utilizada e apreciada na culinária mineira (ROCHA *et al.*, 2008).

Apesar da importância e do potencial nutricional comprovado cientificamente das hortaliças não-convencionais, ainda são insuficientes as iniciativas para a utilização dessas plantas para consumo humano. Levando em consideração que cerca de 795 milhões de pessoas no mundo não comem o suficiente para serem considerados saudáveis pela falta de nutrientes na alimentação, a busca por alternativas no setor de alimentos com a utilização de alimentos não convencionais, atende a uma importante vertente do setor de inovação, uma vez que busca suprir as necessidades nutricionais humanas de forma sustentável a partir do aproveitamento de alimentos oriundos da biodiversidade nacional (FAO, 2014; SOUZA, 2014).

## **2. Coleta de Dados**

Os dados do presente trabalho foram coletados utilizando-se da literatura exposta nos meios eletrônicos, Sciece Direct, Elsevier, PubMed, Periódico Capes, Google Acadêmico e Portais Governamentais nacionais e internacionais. Os trabalhos incluídos nesta revisão foram publicados no período entre 1933 e 2015.

A identidade da planta pesquisada, suas respectivas variedades e propriedades, foram cuidadosamente examinadas com base nos dados e descrições fornecidos nos respectivos trabalhos consultados.

## **3. Desnutrição e a importância das proteínas na alimentação**

Do ponto de vista geral, os alimentos têm como função principal fornecer nutrientes necessários para formação e manutenção de células e tecidos. Uma alimentação equilibrada contempla todas as necessidades nutricionais ao indivíduo em termos de macro e micronutrientes, que posteriormente, irão compor o ciclo metabólico. Uma boa nutrição reduz fadigas musculares, lesões, otimizam os depósitos de energia e garantem a saúde de

forma geral (SHERMAN; COSTILL, 1984; BROUNS *et al.*, 1986; HASSON; BARNES, 1989).

Uma vez que a garantia de bem-estar de uma população está relacionada com o acesso a nutrientes em boa quantidade e qualidade, a ausência dos mesmos pode ter efeitos devastadores. Nesse contexto, surge a definição de desnutrição e subnutrição, caracterizada pela ausência de nutrientes que acarretam no comprometimento da saúde ocasionada por uma série de fatores de natureza clínico-social, tais como, pobreza, fome, infecções e dietas pobres ou inadequadas. Segundo a OMS, mesmo em uma deficiência nutricional moderada, a mesma pode acarretar em sérios prejuízos à saúde humana (BLÖSSNER; DE ONIS, 2005; MS, 2005; WHO, 2005). Dentre esses nutrientes, destacam-se as proteínas como um dos mais importantes para a manutenção dos processos vitais do organismo. Por serem fontes secundárias de reserva energética, e constituintes de vários processos no organismo, a sua degradação pode levar a um colapso fisiológico, resultando em um estado que acarreta morbidade e agravamento de possíveis patologias (MONTE, 2000).

Dentre as principais funções das proteínas estão: atuação no crescimento e manutenção dos tecidos, formação hormonal, transporte de substâncias, proteção imunológica, catalisadores de reações orgânicas e substrato para obtenção de energia. Além disso, esses compostos orgânicos possuem funções de reparação e construção dos tecidos, atua na contração muscular, transporte ou transferência de moléculas no sangue, produção de anticorpos, formação de hormônios, dentre outras funções (CHAVES, 1985; NELSON; COX, 2011).

Uma vez que as proteínas exercem funções de suma importância para o organismo, em casos de fome e insegurança alimentar, a ausência desse nutriente pode acarretar em desnutrição. Essa doença pode ser representada de várias formas, com destaque para a Desnutrição Proteico-calórica (DPC), considerada o seu quadro mais grave. A DPC é caracterizada pela falta de calorias e proteínas na alimentação. Pode ser dividida em duas formas agudas de desnutrição: a Wasting ou Marasmo, caracterizada pela perda de peso rápida, juntamente com a perda de tecido adiposo e muscular, reduzindo cerca de 60% do peso corporal; e o Edema Nutricional ou Doença de Kwashiorkor que é causada pela insuficiente ingestão de proteína e representada pela perda do tecido muscular e manutenção do tecido adiposo (DUBOWITZ, 1965; TRUSSWELL, 1981)

A Síndrome de Kwashiorkor foi descrita por volta dos anos trinta, após observações de sintomas em crianças, e é definida como o grave déficit proteico que conduz a uma depleção visceral precoce de aminoácidos, afetando a função celular e reduzindo o consumo

de oxigênio. Diante disso, ela pode provocar um estado clínico de edema, hipoalbuminemia e esteatose hepática no organismo (WILLIAMS, 1933; MONTE, 2000). Além disso, a Deficiência Proteica (DP) pode ser originada de desordem ou quadro de enfermidade resultante de uma dieta inadequada ou não balanceada, ou até mesmo, de uma falha na absorção e assimilação destes elementos dietéticos (HUGHES; KELLY, 2006; MALAFAIA, 2007).

Dentre os sintomas clínicos ocasionados pela DP, Vituri *et al.* (2008) realizaram estudos com animais alimentados com dietas deficientes em proteínas e observaram que os animais apresentaram uma acentuada redução no consumo, o que resulta em uma perda acentuada de massa corpórea. Tal premissa se baseia na afirmação de que, por ser o tecido muscular esquelético um reservatório de proteína no organismo, o mesmo torna-se bastante sensível à deficiência proteica (DUBOWITZ, 1965), e dessa forma, quando há deficiência na dieta, esse tecido torna-se alvo de depleção (WATERLOW; WEISZ, 1956; OLIVEIRA *et al.*, 1999). No que se refere aos efeitos nos órgãos diante de um panorama de DP, Malafaia (2009) observou uma redução significativa na massa do fígado e do baço em testes realizados com animais submetidos a dietas com DP.

Em estudo realizado por Oliveira e Angelis (2001) foram observadas reduções de até 90% na concentração de albumina plasmática em camundongos *Swiss* alimentados com dietas com baixo teor protéico (3% de proteínas) e com dieta aptotética.

Além das informações citadas, a DP predispõe a uma série de complicações graves, incluindo tendência à infecção, deficiência de cicatrização de feridas, falência respiratória, insuficiência cardíaca, diminuição da síntese de proteínas a nível hepático com produção de metabólitos anormais, diminuição da filtração glomerular e produção de suco gástrico (JEEJEEBHOY *et al.*, 1990).

Portanto, a ausência de proteínas em uma dieta compromete de forma significativa o desenvolvimento e o bem estar social de um indivíduo, além de submeter o organismo a uma série de alterações metabólicas, as quais se não diagnosticado de forma eficiente e em tempo hábil, poderão levar ao óbito. Dentro dessa perspectiva, a utilização de plantas alimentícias com elevados teores de nutrientes surge como possibilidade em programas de combate a desnutrição.

#### **4. Segurança alimentar e os desafios de combate à fome e desnutrição**

Uma vez que a utilização de plantas endêmicas compõe a dieta de várias populações mundiais, debates sobre a garantia de alimentação, qualidade e acesso aos alimentos, tem se tornado um dos principais pilares na construção de estratégias de segurança alimentar. O

direito irrestrito à alimentação e à nutrição de qualidade a todos os indivíduos do planeta estão consignados na Declaração Universal dos Direitos Humanos, os quais foram posteriormente reafirmados no Pacto Internacional sobre Direitos Econômicos, Sociais e Culturais. Tal protocolo afirma que é dever do Estado garantir o bem estar social e o direito ao acesso a alimentos necessários ao seu bem-estar e segurança alimentar (UN, 1986).

Dentro desse contexto, surgiu o conceito de Segurança Alimentar e Nutricional (SAN) definido como a realização do direito de todos ao acesso regular e permanente a alimentos de qualidade, em quantidade suficiente, sem comprometer o acesso a outras necessidades essenciais, tendo como base práticas alimentares promotoras da saúde, que respeitam a diversidade cultural e que sejam socialmente econômica e ambientalmente sustentáveis. A consolidação do conceito de SAN possibilitou o fortalecimento de iniciativas governamentais para a elaboração de políticas públicas de segurança alimentar e combate à desnutrição e à pobreza extrema, principalmente a partir do ano de 2003 com a criação do Programa Fome Zero e a recriação do Conselho Nacional de Segurança Alimentar e Nutricional (CONSEA), bem como políticas de proteção social e produção agrícola (FAO, 2014).

Analisando os efeitos da desnutrição mundial a partir de dados fornecidos pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura - FAO, aproximadamente 795 milhões de pessoas no mundo não comem o suficiente para serem consideradas saudáveis, ou seja, uma em cada nove pessoas permanece subnutrida. Embora o número de pessoas desnutridas no mundo ainda seja bastante significativo, esse número sofreu uma redução de 18,6% da população em 1990-92 para pouco mais de 10,9% da população no período de 2014-16. Do contingente de pessoas com deficiência nutricional no mundo, cerca de 511,7 milhões vivem na Ásia e na região do Pacífico; 232,5 milhões na África e 34,3 milhões na América Latina e Caribe (FAO, 2015). Os impactos gerados pela fome e desnutrição são tão proeminentes, que os mesmos lideram a lista dos 10 maiores riscos para a saúde humana, matando anualmente mais do que a AIDS, malária e tuberculose (UNAIDS, 2010).

Dentro do âmbito nacional, o Brasil era considerado o país da América do Sul com o maior número de subnutridos, possuindo cerca de 15,6 milhões de pessoas até meados dos anos 2000. Porém, no último levantamento realizado em 2009, esse número era de cerca de 10 milhões de pessoas. Esse contingente sofreu redução de 6,9% para 5% da população brasileira, no período de 2004 a 2009 (DE ONIS *et al.*, 2004; FAO, 2014). Nos últimos anos, a DNP tem sofrido uma redução significativa, entretanto, essa doença continua sendo um

relevante problema da saúde pública brasileira, com destaque para a zona rural das regiões Norte e Nordeste, e a zona periférica dos grandes centros urbanos e capitais (MDA, 2010).

Dessa forma, o combate à desnutrição e à má distribuição de alimentos tem fomentado iniciativas na busca de alternativas para tais problemas. Este entendimento tem desencadeado decisões internacionais para a melhoria econômica das populações, através de estratégias e programas para grupos de maior risco nutricional e fragilidade de segurança alimentar (WORLD BANK, 1986).

No Brasil, observa-se nos últimos anos, um esforço governamental para combate à fome e à pobreza através de políticas de inclusão sócio-produtiva e de segurança alimentar. Dentre eles, pode-se citar o programa Brasil Sem Miséria, programa que envolve uma série de ações de fortalecimento de famílias que vivem abaixo da linha da pobreza a partir do incentivo da implementação de pequenas unidades produtivas familiares. Além disso, o escopo do projeto prevê a articulação com outros programas de aquisição de alimentos e alimentação escolar, para que a parte da produção familiar seja destinada à comercialização dentro da própria comunidade (MDA, 2010; MDS, 2014). Além disso, políticas governamentais como as utilizadas pelo Instituto Nacional de Nutrição e Alimentação vêm consolidando medidas para a divulgação e indução de consumo de alimentos alternativos e não convencionais como estratégia no combate à desnutrição de populações mais carentes (GUIMARÃES *et al.*, 1994).

A FAO tem atuado de forma efetiva, alinhada ao plano de atuação semelhante a atuação brasileira, em que se baseia na orientação a países que possuem políticas de combate à desnutrição, através do incentivo do fortalecimento do Programa Mundial de Alimentos. Essas medidas, têm por natureza o estímulo ao acesso aos alimentos através de programas locais de inclusão sócio-produtiva, com a finalidade de incremento de alimentos alternativos ou subutilizados, que possuam propriedades nutricionais relevantes, para que possam ser utilizados como suplementos alimentares na dieta dessas comunidades (FAO, 2009).

### **5. *Pereskia aculeata* Miller e seu potencial como complemento alimentar proteico**

Algumas espécies já demonstraram potencialidade de garantir a segurança alimentar e nutricional devido à grande quantidade de nutrientes na sua composição. Tal utilização justifica-se, pois, proteínas de origem animal são mais caras e de difícil acesso em países subdesenvolvidos, fazendo-se necessária a utilização de alimentos não convencionais nessas localidades para atender a demanda por fontes seguras de proteínas que possam ser incluídas na dieta da população. A utilização do Concentrado Proteico de Folhas– CPF é a forma mais

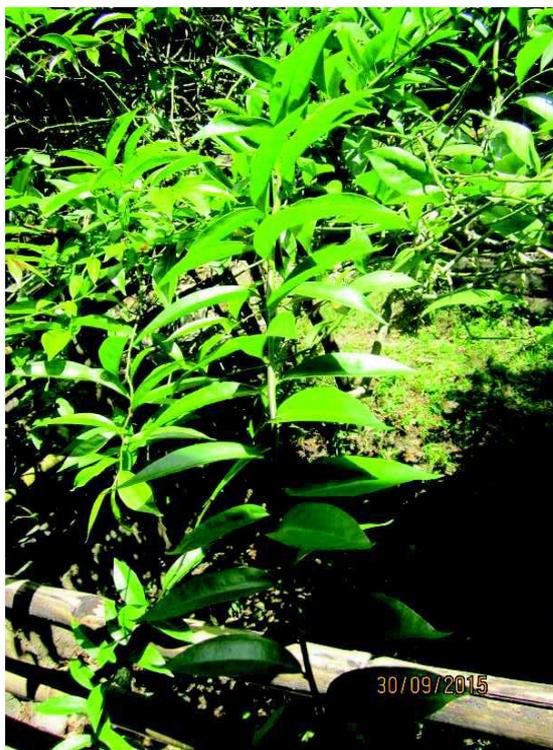
usual de utilização de proteína vegetal nas dietas alimentares ao redor do planeta. No mundo, cerca de 70% das fontes de proteínas consumidas são de origem vegetal, e 30% de origem animal. Apesar da fonte de origem vegetal possuir uma proteína de menor qualidade, constituem a base alimentar da maioria dos povos, por serem ofertadas em maiores quantidades, destacando-se as sementes oleaginosas e os cereais (GAVA, 2010).

Nesse contexto, a *Pereskia aculeata* Miller (Figura 1) surge como uma espécie a ser explorada pelo fato da sua boa distribuição regional e propriedades funcionais. Tal espécie tem sido atestada por pesquisadores como detentora de um grande potencial para a utilização na suplementação alimentar, por apresentar um alto teor de proteínas. Essa planta pertence ao reino Plantae, classe Magnoliopsida, ordem Caryophyllales, família Cactaceae e gênero *Pereskia*. O seu nome é originário do latim e significa “rogai por nós”. É conhecida popularmente como Ora-pro-nóbis, Lobrobó, Groselha-da-américa, sendo classificada como nativa não endêmica. Esta hortaliça possui ramos com generosos espinhos, folhas suculentas, carnosas e comestíveis, com a presença de mucilagem, sendo utilizadas em vários pratos da culinária regional como farinhas, saladas, refogados, tortas e massas alimentícias, como o macarrão, e remédios caseiros (MERCÊ *et al.*, 2001; ROSA; SOUZA., 2003; DUARTE; HAYSASHI, 2005; KINUPP, 2006; TOFANELLI; RESENDE, 2011; ALMEIDA; CORRÊA, 2012; ZAPPI *et al.*, 2012)

Esta espécie possui características agronômicas bastante favoráveis ao seu cultivo, sendo uma planta rústica, vigorosa e de fácil propagação (TOFANELLI; RESENDE, 2011), tem baixa demanda hídrica e baixa incidência de doenças, além de sobreviver a longos períodos de seca, chuvas contínuas e geadas brandas. Essas características favorecem o cultivo doméstico como uma hortaliça de baixo custo, principalmente se cultivada em regiões do país com baixas incidências de chuva, como a região Nordeste (MADEIRA; SILVEIRA, 2010; SANTOS *et al.*, 2012).

No Brasil, ela é encontrada em quase todo o território nacional com predominância para a região Centro-Oeste e os estados de Minas Gerais e Bahia. É caracterizada como uma trepadeira arbustiva que ocorre principalmente em regiões áridas ou levemente áridas. Tanto as folhas quanto os frutos são utilizados na culinária e na medicina tradicional (DUARTE; HAYSASHI, 2005; TURRA *et al.*, 2007).

**Figura 1:** *Pereskia aculeata* Miller



A *Pereskia aculeata* Miller é considerada um excelente complemento nutricional devido ao seu alto conteúdo de proteínas; em média 20% de teor proteico e 85% dedigestibilidade; fibras, ferro, cálcio, sais minerais e vitaminas. Além disso, possui elevados valores de aminoácidos essenciais, destacando-se a lisina, leucina e valina. (ROSA; SOUZA, 2003; DUARTE; HAYASHI, 2005; ROCHA *et al.*, 2008; MAPA, 2010; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2010; MAZIA; SARTOR, 2012).

Silva e Pinto (2005) observaram em seus estudos que esta planta possui elevados teores de proteínas (24,73%) e minerais, com destaque para o cálcio, com 3.800 mg. 100 g, e ferro (28,12 mg. 100 g). Rocha *et al.* (2008) em suas pesquisas com a confecção de macarrão a base de folhas de Ora-pro-nóbis, identificou teores de proteínas de 22,93%, fibras de 12,64%, cinzas 18,07%, lipídeos 3,64%, carboidratos 36,18% e calorias de 269,16 Kcal em 100 g de matéria seca.

Outra importante propriedade nutricional é a sua alta concentração de ferro. Em estudos realizados por Silva e Pinto (2005) e Takeiti *et al.* (2009), os autores observaram que as folhas dessa espécie apresentavam teores de ferro variando de 14,18 a 28,12 mg por 100 g de matéria seca. Fazendo uma correlação entre as concentrações de ferro observadas pelos dois autores, quando comparadas aos valores de alimentos tradicionais e historicamente

notabilizados pela grande concentração de ferro, presentes na Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2011), observa-se que a Ora-pro-nóbis possui valores superiores a vários desses alimentos, demonstrados na Tabela 1.

**Tabela 1.** Concentração de ferro em folhas de *Pereskia aculeata* Miller

Alimento	Teores de Fe em 100 g de MS
Ora-pro-nóbis	14,18 mg e 28,12 mg
Beterraba crua	0,3 mg
Beterraba cozida	0,2 mg
Couve manteiga refogada	0,5 mg
Espinafre refogado	0,6 mg
Fígado bovino grelhado	5,8 mg
Grão de bico cru	5,4 mg
Lentilha crua	7,0 mg
Feijões fradinho cru	5,1 mg
Feijão preto cru	6,5 mg
Feijão roxo cru	6,9 mg
Feijão carioca cru	8,0 mg

Fontes: Silva e Pinto (2005); TACO (2011); Takeiti *et al.* (2009)

Outra característica de destaque é a grande quantidade de lisina presente nas folhas, a qual compõe o grupo dos aminoácidos essenciais, necessários para produção de proteínas. Almeida Filho e Cambraia (1974) relataram que o teor de lisina de Ora-pro-nóbis foi 23,1 vezes superior ao valor de lisina de couve e de alface, e 7,2 vezes superior ao do espinafre, plantas reconhecidas pelo seu alto valor nutricional.

Além das grandes propriedades nutricionais já citadas, há vários relatos na literatura sobre a utilização de Ora-pro-nóbis no combate às mais diversas doenças. Alguns estudos têm demonstrado que esta planta, além das propriedades apresentadas, possui características medicinais, atividade antitumoral, antirreumático, antiúlcera, e anti-inflamatória (TAN *et al.*, 2005).

Souza *et al.* (2012), afirmam em seus estudos, que a ampliação e melhoria do uso e conhecimento sobre plantas tradicionais, ou Hortaliças não-convencionais, podem contribuir para a melhoria do padrão nutricional, bem-estar e renda da população rural, além da redução da extinção das espécies do ponto de vista ambiental e cultural. Assim, devido à quantidade relativamente grande de proteínas e outros componentes importantes, é considerada uma alternativa para o incremento e o enriquecimento da qualidade na alimentação. Entretanto, ao

mesmo tempo em que a respectiva espécie apresenta propriedades nutricionais pertinentes, a segurança da ingestão desses alimentos deve ser atestada através de pesquisas científicas.

#### **6. Perspectivas e importância dos ensaios de toxicidade e aspectos antinutricionais na utilização da *Pereskia aculeata* Miller na suplementação alimentar**

Diante do exposto, após análise das propriedades nutricionais da *Pereskia aculeata* Miller na alimentação humana como fonte de suplemento alimentar para o combate à fome e desnutrição, surge a perspectiva da utilização de farinhas das folhas dessa espécie, por órgãos governamentais, na construção de estratégias de garantia de boa alimentação. Entretanto, antes do desenvolvimento de produtos para tais fins, são necessários testes laboratoriais para a determinação de possíveis efeitos de substâncias presentes nas folhas, e a sua reação no organismo humano. Dentre estes testes, podemos destacar os ensaios de toxicidade aguda e crônica via oral.

Os ensaios de toxicidade indicam o tempo ou a concentração em que uma determinada substância, de um respectivo material de estudo, é potencialmente deletéria após o contato ou interação com a membrana ou um sistema biológico específico, podendo não produzir um efeito adverso se a concentração do produto for baixa, ou o tempo de contato for insuficiente. Ressalta-se que a concentração e o tempo de exposição estão diretamente relacionados (FONSECA, 1991). Desta maneira, os testes de toxicidade são desenvolvidos e aplicados com os objetivos de avaliar ou prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos, após a exposição humana à determinada substância química, e dimensionar a toxicidade relativa de substâncias específicas, podendo ser um medicamento, um praguicida, um agente químico industrial, dentre outros, utilizando, principalmente, modelos animais para este propósito (FORBES; FORBES, 1994; CAZARIN *et al.*, 2004).

Maciel *et al.* (2002) afirma que face à importância das propriedades tóxicas que compostos químicos apresentam, os mesmos só devem ser preparados se certas questões forem respondidas através das comprovações científicas, sendo necessária a ampliação dos estudos das plantas brasileiras, principalmente nas áreas de fitoquímica e etnofarmacologia.

Para a avaliação toxicológica, existem testes específicos e regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Segundo a Resolução Especial nº 90, os estudos toxicológicos podem ser ensaios de longa duração ou de doses repetidas, podendo ser subdivididos em experimentos de quatro semanas (30 dias de tratamento) ou de doze semanas (90 dias de tratamento) via oral (ANVISA, 2004). Além da determinação de propriedades tóxicas, tais testes são realizados para discernir sobre a segurança e confiabilidade do substrato, atestando a sua característica atóxica. Além disso, existem os

protocolos internacionalmente reconhecidos e preconizados por instituições internacionais, como aqueles publicados pela Organização para Cooperação e Desenvolvimento Econômico (Organization for Economic Co-operation and Development – OECD) que atuam na regulação dos testes agudos, subagudos e crônicos através dos guias experimentais estatísticos que atestam a confiabilidade da propriedade tóxica de uma determinada substância com a menor utilização possível de animais a partir da curva dose-resposta (OECD, 2001).

No âmbito da utilização de folhas de Ora-pro-nóbis na alimentação humana e seus respectivos efeitos no organismo, alguns autores afirmam que a mesma possui características atóxicas (DAYRELL; VIEIRA, 1977; MERCÊ *et al.*, 2001). Santos *et al.* (2011) ao realizarem um estudo com extrato etílico bruto das folhas de Ora-pro-nóbis em hemácias humanas, observaram ausência de atividade hemolítica, afirmando que essa planta seria atóxica, uma vez que não houve lise celular.

Em outro estudo realizado por Silva *et al.* (2012) testando a inclusão de folhas na dieta de ratos machos recém-desmamados, se verificou que o grupo que recebeu a planta apresentou redução nos desempenhos dos testes de posição e reflexo de flexão, afirmando com isso o autor que a utilização dessa planta como suplemento alternativo pode implicar em prejuízos no desenvolvimento de ratos na fase inicial. Nesse mesmo estudo, também se avaliou o efeito da inclusão de folhas na ração comercial, como forma de substituição da fonte de proteína convencional, e a restrição parcial de proteínas na dieta sobre ganho de peso, consumo alimentar, hematócrito e nas proteínas plasmáticas totais. Com relação ao ganho de peso, pôde-se perceber que o grupo alimentado com dieta contendo a planta não conseguiu ter o mesmo ganho de peso ponderal que os outros grupos. Com relação às análises hematológicas não houve influência. Já com relação ao resultado de proteínas plasmáticas totais, o autor observou uma redução significativa nesses valores nos grupos com dieta à base da ora-pro-nóbis. Assim, para esses ensaios, os autores concluíram que a suplementação alimentar com folhas de *Pereskia aculeata* Miller pode influenciar de forma negativa no ganho de peso ponderal, ingestão alimentar e concentração de proteínas plasmáticas totais.

Em outro estudo mais atual realizado pela mesma equipe, só que em ratos fêmeas, com o objetivo de avaliar as propriedades toxicológicas aguda de folhas de *Pereskia aculeata* Miller através da administração via gavagem em diferentes concentrações (0 mg; 1250; 2500 ou 5000 mg/kg de peso corporal), não foi verificada alteração significativa nos parâmetros avaliados: ingestão alimentar, peso por animais, excreção fecal e reações clínicas e

comportamentais. No entanto, três animais que receberam a maior concentração apresentaram diarreia 4 e 8 horas após a administração do extrato de *Pereskia aculeata*, permanecendo um ainda após 24 horas (SILVA *et al.*, 2014).

Embora o número de pesquisas e publicações venha crescendo nos últimos anos, ainda são escassos os estudos sobre o efeito toxicológico, em diferentes níveis fisiológicos e bioquímicos no organismo e sob diferentes períodos de exposição, a partir da utilização e consumo de folhas de Ora-pro-nóbis. Embora alguns autores afirmem que a respectiva espécie possui efeitos atóxicos ou não apresentam efeitos antinutricionais, estudos recentes demonstram que houve alterações significativas em vários parâmetros analisados. Visto que o uso dessa planta é bastante difundido pela população de algumas regiões do centro do Brasil, e ao mesmo tempo, apresenta propriedades significativas e relevantes com relação à presença de nutrientes que possam ser utilizados como estratégia de combate a DNP, existe a necessidade de executar estudos de toxicidade acerca de preparações de produtos para a possível utilização no consumo humano.

## **7. Considerações Finais**

Conforme pôde ser observado, o Brasil é o país com a maior fitodiversidade do mundo e detentor de uma grande riqueza natural. Dessa forma, a identificação das espécies nativas, catalogação e a realização de estudos para a determinação de suas propriedades, possibilitam a construção de programas e estratégias de combate à desnutrição. Tais informações são importantes pois possibilitam a difusão de uma maior utilização na matriz nutricional, desde que as suas propriedades, principalmente as antinutricionais e tóxicas, sejam atestadas por pesquisas científicas.

## 8. Referências Bibliográficas

- Almeida, F. J.; Cambraia, J. Estudo do valor nutritivo do “Ora-pro-nóbis” (*Pereskia aculeata* Mill.). *Revista Ceres*, Viçosa, 21, 114, 105-111, 1974.
- Almeida, M. E. F.; Corrêa, A. D. Utilização de cactáceas do gênero *Pereskia* na alimentação humana em um município de Minas Gerais. *Ciência Rural*, Santa Maria, 42, 4, 751-756, 2012. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0103-84782012000400029>.
- ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Resolução Especial nº 90*, de 16 de março de 2004. Brasília: DOU de 18/03/2004.
- Blössner, M.; De Onis, M. *Malnutrition: quantifying the health impact at national and local levels*, 2005. Disponível em: <[http://www.who.int/quantifying\\_chimpacts/publications/MalnutritionEBD12.pdf](http://www.who.int/quantifying_chimpacts/publications/MalnutritionEBD12.pdf)>. Acesso em: nov. 2015.
- Brouns, F.; Saris, W.; Hoor, F. T. Nutrition as a factor I the prevention of injuries in recreational and competitive downhill skiing. *Journal of Sports Medicine*, Baltimore, 9, 4, 112-119, 1986.
- Chaves, N. *Nutrição básica e aplicada*. Rio de Janeiro: Guanabara, 1985.
- Cazarin, K. C. C.; Correa, C. L.; Zambrone, F. A. D. Redução, refinamento e substituição do uso de animais em estudos toxicológicos: uma abordagem atual. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 40, 3, 2004. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322004000300004>.
- Dayrell, M. S., Vieira, E. C. Leaf protein concentrate of the cactacea *Pereskia aculeata* Mill. I. Extraction and composition. *Nutrition Reports International*, 15, 5, 29-537, 1977.
- De onis, M.; Blossner, M.; Borghi, E; Morris, R.; Frongillo, E. A. Methodology for estimating regional and global trends of child malnutrition. *International Journal of Epidemiology*, 33, 6, 1260-1270, 2004. doi: 10.1093/ije/dyh202.
- Duarte, M. R.; Hayashi, S. S. Estudo anatômico de folha e caule de *Pereskia aculeata* Miller (Cactaceae). *Revista Brasileira de Farmocognosia*, João Pessoa, 15, 2, 103-109, 2005. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2005000200006>.
- Dubowitz, V. Enzyme histochemistry of skeletal muscle. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 28, 516-24, 1965.
- FAO – Food and Agriculture of the United Nations. *Biodiversity for a world without hunger*. 2010. Disponível em: <<http://www.fao.org/biodiversity/components/plants/en>> Acesso em: nov. 2015.
- FAO – Food and Agriculture of the United Nations. *Climate Change and Hunger*, 2009. Disponível em: <http://cdm15738.contentdm.oclc.org/utis/getfile/collection/p15738coll2/id/17143/filename/17144.pdf> >. Acesso em: nov. 2015.
- FAO – Food and Agriculture of the United Nations. *Estado de segurança alimentar e nutricional no Brasil: um retrato multidimensional*, 2014. Disponível em: <[https://www.fao.org.br/download/SOFI\\_p.pdf](https://www.fao.org.br/download/SOFI_p.pdf)>c. Acesso em: nov. 2015.
- FAO; IFAD; WFP. *The State of Food Insecurity in the World 2015*, 2015. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-i4646e.pdf>> Acesso em: nov. 2015.
- Fonseca, A. L. *A biologia das espécies Daphnia leavis, Ceriodaphnia dubia silvestri* (Crustacea, Cladocera) e *Poecilia reticulata* (Pisces, Poeciliidae) e o comportameto destes em testes de toxicidade aquática com efluentes industriais. São Paulo, Dissertação (Mestrado em Hidráulica e Saneamento) - UFSCAR, 1991.
- Forbes, V. E.; Forbes, T. L. *Ecotoxicology in theory and practice*. Londres: Chapman and Hall, p. 247, 1994.
- Gava, A. J. *Princípios de tecnologia de alimentos*. São Paulo: Nobel, 7. ed., 2010.

- Guimarães, C. A.; Brandão, C. C. T.; Coser, L. R.; Albuquerque, Z. P.; Siu, C. E.; Coitinho, D. C. *Conclusões do Grupo de Trabalho Sobre “Alimentação Alternativa”*, Brasília: Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Alimentação e Nutrição/Organização Pan-Americana da Saúde, Fundo das Nações Unidas para a Infância, 1994.
- Hasson, S.; Barnes, W. S. Effects of carbohydrate ingestion on exercise of varying intensity and duration. *Sports Medicine*, Auckland, 4, 2, 110-201, 1989.
19. Hughes, S.; Kelly, P. Interactions of malnutrition and immune impairment, with specific reference to immunity against parasites. *Parasite Immunology*, 28, 11, 577-588, 2006. doi: <http://dx.doi.org/10.1111%2Fj.1365-3024.2006.00897.x>.
- Jeejeebhoy, K. N.; Detsky, A. S.; Baker, J. P. Assessment of nutritional status. *Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*, 14, 5, 193-196, 1990. doi: 10.1177/014860719001400509.
- Kinupp, V. F. Plantas alimentícias alternativas no Brasil, uma fonte complementar de alimento e renda. *Revista Brasileira de Agroecologia*, 1, 1, 333-336, 2006.
- Kinupp, V. F.; Barros, I. B. I. Riqueza de Plantas Alimentícias Não-Convencionais na Região de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. *Revista Brasileira de Biociências*, Porto Alegre, 5, 1, 63-65, 2007.
- Maciel, M. A. M.; Pinto, A. C.; Veiga Jr, V. F. Plantas Medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. *Química Nova*, São Paulo, 25, 3, 429-438, 2002. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422002000300016>.
- Madeira, N. R.; Silveira, G. S. R. Ora-pro-nóbis. *Globo Rural*, São Paulo, 294, 100-101, 2010.
- MAPA - Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. *Manual de Hortaliças Não-convencionais*, 2010. 94p. Disponível em: <[http://www.agricultura.gov.br/arq\\_editor/file/vegetal/Qualidade/Qualidade%20dos%20Alimentos/manual%20hortali%C3%A7as\\_WEB\\_F.pdf](http://www.agricultura.gov.br/arq_editor/file/vegetal/Qualidade/Qualidade%20dos%20Alimentos/manual%20hortali%C3%A7as_WEB_F.pdf)>. Acesso em: dez. 2015.
- MDA - Ministério do Desenvolvimento Agrário. *Fome Zero: a experiência brasileira*, 2010. Disponível em: <[http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user\\_arquivos\\_64/pageflip-4204234-487363-lt\\_Fome\\_Zero\\_\\_A\\_experinc-1750637.pdf](http://www.mda.gov.br/sitemda/sites/sitemda/files/user_arquivos_64/pageflip-4204234-487363-lt_Fome_Zero__A_experinc-1750637.pdf)>. Acesso em: dez. 2015.
- Mercê, A. L.; Landaluze, J. S.; Mangrich, A. S.; Szpoganicz, B.; Sierakowski, M. R. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co<sup>2+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Ni<sup>2+</sup>. *Bioresource Technology*, 76, 1, 29-37, 2001. doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524\(00\)00078-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0960-8524(00)00078-X).
- MDS – Ministério do Desenvolvimento Social e Combate a Fome. *O Brasil Sem Miséria*, 2014. Disponível em: <[http://www.mds.gov.br/webarquivos/publicacao/brasil\\_sem\\_miseria/livro\\_o\\_brasil\\_sem\\_miseria/livro\\_obrasilsemmiseria.pdf](http://www.mds.gov.br/webarquivos/publicacao/brasil_sem_miseria/livro_o_brasil_sem_miseria/livro_obrasilsemmiseria.pdf)>. Acesso em: nov. 2015.
- Malafaia, G. Efeitos das deficiências de ferro e zinco no sistema imune. *Revista da Pesquisa & Pós-Graduação*, 8, 2, 5-9, 2007.
- Malafaia, G. Malnutrition and infection: a review. *Revista Brasileira de Nutrição Clínica*, 5, 24-33, 2009.
- MMA - Ministério do Meio Ambiente. *Biodiversidade Brasileira*, 2015. Disponível em: <http://www.mma.gov.br/biodiversidade/biodiversidade-brasileira> >. Acesso em: dez. 2015
- Monte, C. M. G. Desnutrição: um desafio secular a nutrição infantil. *Jornal de pediatria*, Rio de Janeiro, 76, 3, 285-297, 2000.
- MS – Ministério da Saúde. *Manual de atendimento da criança com desnutrição grave em nível hospitalar*, 2005. Disponível em: <<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/4274/AtendimentoDesnutricaoAtend.pdf?sequence=1>>. Acesso: nov. 2015.
- Mazia, R. S; Sartor, C. F. P. Influência do tipo de solo usado para o cultivo de *Pereskia*

- aculeata* sobre propriedade proteica. *Revista Saúde e Pesquisa*, Maringá, 5, 1, 59-65, 2012.
- Nelson, D. L.; Cox, M. M. *Princípios de bioquímica de Lehninger*. Porto Alegre: Artmed, 6. ed. 2011.
- NEPA – Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação. *Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO)*. 4ª ed. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. 30-53. Disponível em: <[http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco\\_4\\_edicao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf?arquivo=taco\\_4-versao\\_ampliada\\_e\\_revisada.pdf](http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4-versao_ampliada_e_revisada.pdf)>. Acesso em: jan. 2016.
- OECD - Organisation for Economic Cooperation and Development. Acute Oral Toxicity – Up-and-Down Procedure. 2001. Disponível em: <<http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948378.pdf>>. Acesso: jan. 2016.
- Oliveira, F. L.; Oliveira, A. S. B.; Schmidt, B.; Amancio, O. M. S. Desnutrição energética intra-uterina em ratos: alterações músculo-esqueléticas na 1ª e 2ª gerações. *Jornal de Pediatria*, Rio de Janeiro, 75, 350-356, 1999.
- Oliveira, I. M. V.; Angelis, R. C. Requisitos protéicos mínimos de diferentes fontes vegetais para ratos de laboratório em fase de crescimento. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, 38, 1, 23-28, 2001. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S1413-95962001000100004>.
- Pinto, N. A. V. D. *Avaliação das folhas, limbos e caules da taioba (Xanthosoma sagittifolium Schott), visando seu aproveitamento na alimentação humana*. Lavras, Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – UFL, 1998.
- Rocha, D. R. C.; Pereira Jr, G. A.; Vieira, G.; Pantoja, L.; Santos, A. S.; Pinto, N. A. V. D. Macarrão adicionado de ora-pronóbis (*Pereskia aculeata* Miller) desidratado. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, 19, 4, 459-465, 2008.
- Rosa, S. M.; Souza, L. A. Morfo – anatomia do fruto (hipanto, pericarpo e semente) em desenvolvimento de *Pereskia Aculeata* Miller (Cactaceae). *Acta Scientiarum Biological Sciences*, Maringá, 2, 25, 415-428, 2003. doi: <http://dx.doi.org/10.4025/actascibiolsci.v25i2.2046>.
- Santos, A. G.; Tibúcio, C. S.; Sartor, C. F. P.; Cortez, L. E. R. Avaliação das atividades antimicrobiana sobre patógenos Bucais e hemolítica das folhas de pereskia aculeata. In: *Anais do Encontro Internacional de Produção Científica Cesumar*. Maringá, 28 de out., 2011.
- Santos, I. C.; Pedrosa, M. W.; Carvalho, O. C.; Guimarães, C. D.; Silva, L. S. *Ora-pronóbis: da cerca à mesa*, Circular Técnica, n.177, 2012. Disponível em: <[http://www.epamig.br/index.php?option=com\\_docman&task=cat\\_view&gid=68&dir=DDES&order=date&limit=10&limitstart=50](http://www.epamig.br/index.php?option=com_docman&task=cat_view&gid=68&dir=DDES&order=date&limit=10&limitstart=50)> Acesso em: jan. 2016.
- Sherman, W. M.; Costill, D. L. The marathon: dietary manipulation to optimize performance. *American Journal of Sports Medicine*, Columbus, 24, 5, 200-215, 1984. doi: 10.1177/036354658401200107.
- Souza, L. F. *Aspectos fitotécnicos, bromatológicos e componentes bioativos de Pereskia aculeata, Pereskia grandifolia e Anredera cordifolia*. Porto Alegre, Tese (Doutorado em Fitotecnia) - UFRGS, 2014.
- Silva, A. L.; Silva, D. O.; Campesato, C. Efeito da dieta contendo a planta *Pereskia aculeata*, Miller sobre o reflexo de animais em fase de crescimento. In: *Anais do XXII Simpósio de Plantas Mediciniais do Brasil*. Bento Gonçalves, 21 de set., 2012.
- Silva, D. O. ; Helbig, E. ; Vargas, C. G. ; Seifert, M. ; Dode, J. ; Silva, A. L. Efeito da dieta contendo *Pereskia aculeata*, Miller e da restrição parcial de proteína em ratos. In: *Anais do XIV Encontro de Pós Graduação da UFPel*. Pelotas, 31 de out., 2012.
- Silva, D. O. ; Gaikwad, N. W.; Kucera, H. B.; Nora, L.; Vargas, C. G.; Seifert, M. Avaliação da toxicidade aguda de folhas de *Pereskia aculeata*. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Nutrição*. Vitória, 20 de set., 2014.

- Silva Júnior, A. A. da; Nunes, D. G.; Bertoldi, F. C.; Palhano, M. N.; Komiekiewicz, N. L. K. Pão de ora-pro-nóbis - um novo conceito de alimentação funcional. *Agropecuária Catarinense*, 23, 1, 35-37, 2010.
- Silva, M. C.; Pinto, N. A. V. D. Teores de nutrientes nas folhas de taioba, ora-pro-nóbis, serralha e mostarda coletadas no município de Diamantina. In: *Anais da Fundação educacional do vale do Jequitinhonha*. Diamantina, p. 86, 2005.
- Souza, L. F.; Silveira, C. S.; Silveira, T. M. T.; Barros, I. B. I. . Produção de mudas de *Pereskia aculeata* Mill. (ora-pro-nóbis), utilizando diferentes doses de AIB. In: *Anais do Simpósio de Segurança Alimentar*. Gramado, 23 de ago., 2012.
- Takeiti, C. Y.; Antonio, G. C.; Motta, E. M. P.; Collares-Queiroz, F. P.; Park, K. J. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 60, 148-160, 2009. doi: 10.1080/09637480802534509.
- Tan, M. L.; Sulaiman, S. L.; Najimuddin, N.; Samian, M. R.; Muhammad, T. S. T. Methanolic extract of *Pereskia bleo*(Kunth) DC. (Cactaceae) induces apoptosis in breast carcinoma, T47- D cell line. *Journal of Ethnopharmacology*, 96, 1, 287- 294, 2005. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.09.025>.
- Tofaneli, M. B. D.; Resende, S. G. Sistema de condução na produção de folhas de ora-pro-nóbis. *Pesquisa Agropecuária Tropical*, Goiânia, 41, 3, 466-469, 2011.
- Trusswell, A. S. Protein versus energy in protein energy malnutrition. *South African Medical Journal*, 59, 753-756, 1981.
- Turra, A. F.; Marçal, F. J. B.; Baretta, I. P.; Takemura, O. S.; Laverde Jr, A. Avaliação das propriedades antioxidantes e susceptibilidade antimicrobiana de *Pereskia grandifolia* Haworth (cactaceae). *Arquivos de Ciências da Saúde Unipar*, 11, 1, 9-14, 2007.
- UNAIDS- Joint United Nations Program on HIV/AIDS. *UNAIDS Report on the global AIDS epidemic*, 2010 . Disponível em: <[http://www.unaids.org/globalreport/Global\\_report.htm](http://www.unaids.org/globalreport/Global_report.htm)>. Acesso em: nov. 2015.
- UN – United Nations. *Declaration on the Right to Development - 41/128*, 1986. Disponível em: <<http://www.un.org/documents/ga/res/41/a41r128.htm>>. Acesso em: dez. 2015.
- Vituri, C. L.; Alvarez-Silva, M.; Trentin, A. G.; Borelli, P. Capacidade da matriz extracelular da medula óssea de induzir proliferação de células mielóides in vitro no modelo de desnutrição protéica em camundongos. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 44, 3, 493-500, 2008. doi: <http://dx.doi.org/10.1590/S151693322008000300020>.
- Waterlow, J. C.; Weisz, J. The fat protein and nucleic acid of liver in malnourished human infant. *The Journal of Clinical Investigation*, 35, 346-354, 1956. doi: <http://dx.doi.org/10.1172%2FJCI103284>.
- Williams, C. D. A nutritional disease of childhood associated with a maize diet. *Archives of Disease in Childhood*, 8, 48, 423-433, 1933.
- World Bank. *Poverty and hunger: issues and options for food security in developing countries*, 1986. Disponível em: <[http://www-wds.worldbank.org/external/default/WDSContentServer/WDSP/IB/1999/09/17/000178000\\_98101901455676/Rendered/PDF/multi\\_page.pdf](http://www-wds.worldbank.org/external/default/WDSContentServer/WDSP/IB/1999/09/17/000178000_98101901455676/Rendered/PDF/multi_page.pdf)>. Acesso em: nov. 2015.
- WHO - World Health Organization. *Malnutrition. Quantifying the health impact at national and local levels*, 2005. Disponível em: [http://www.who.int/quantifying\\_ehimpacts/publications/MalnutritionEBD12.pdf](http://www.who.int/quantifying_ehimpacts/publications/MalnutritionEBD12.pdf). Acesso em: nov. 2015.
- Zarpe, D.; Taylor, N.; Machado, M. *Lista de espécies flora do Brasil*, 2012. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2012/FB001633>>. Acesso em: dez. 2015.

**Anexo 2.** Certificado de aprovação do projeto de pesquisa “Avaliação de possíveis alterações metabólicas em camundongos submetidos a uma dieta crônica de suplementação alimentar com *Pereskia aculeata* Miller” pelo CEPA/UFC.



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-270 Fortaleza-CE

### CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “AVALIAÇÃO DE POSSÍVEIS ALTERAÇÕES METABÓLICAS EM CAMUNDONGOS SUBMETIDOS A UMA DIETA CRÔNICA DE SUPLEMENTAÇÃO ALIMENTAR COM PERESKIA ACULEATA MILLER”, protocolo nº 09/2016, sob responsabilidade da Profa. Dra. Juliana Jales de Hollanda Celestino, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica - encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto 6899 de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e foi adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA), foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFC) da Universidade Federal do Ceará, em reunião em 06 de junho de 2016

Vigência do projeto	01/12/2015 a 30/06/2016
Espécie/Linhagem	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de Animais	135
Peso/Idade	25-35g / 42 dias
Sexo	Machos / Fêmeas
Origem	Biotério Central da UFC

Fortaleza, 06 de junho de 2016

  
Prof. Dr. Rodrigo Siqueira  
Coordenador do CEUA - UFC

UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ  
RODRIGO JOSÉ BEZERRA DE SIQUEIRA  
COORDENADOR DA COMISSÃO DE ÉTICA E DO USO COM  
ANIMAIS - CEUA/UFC - Matrícula Sisaep: 1520734

**Anexo 3.** Concentração plasmática de glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina, globulina, proteínas totais, albumina, AST e ALT dos camundongos após o tratamento diário consecutivo por 30 dias com ração padrão e farinha de folhas de *P. aculeata*. Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), dos grupos experimentais tratados com ração padrão (CN), 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% de inclusão de farinha de *P. aculeata* (FPA 20%) - (ANOVA com pós-teste de Tukey).

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CN	FPA 5%	FPA 10%	FPA 20%
	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M
Glicose (mg/dL)	188,80 $\pm$ 8,95	163,50 $\pm$ 5,83	172,00 $\pm$ 0,78	115,30 $\pm$ 1,64
Colesterol Total (mg/dL)	126,00 $\pm$ 3,98	116,00 $\pm$ 2,74	118,70 $\pm$ 2,27	117,30 $\pm$ 0,68
Triglicerídeos (mg/dL)	208,00 $\pm$ 13,72	116,50 $\pm$ 7,73	168,70 $\pm$ 5,26	115,30 $\pm$ 0,75
Ureia (mg/dL)	45,60 $\pm$ 3,13	35,00 $\pm$ 0,69	32,00 $\pm$ 0,29	34,67 $\pm$ 0,45
Creatinina (mg/dL)	0,45 $\pm$ 0,02	0,42 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,00	0,44 $\pm$ 0,00
Globulina (U/L)	1,08 $\pm$ 0,03	1,00 $\pm$ 0,0	1,46 $\pm$ 0,08	0,86 $\pm$ 0,01
Proteínas Totais (g/dL)	3,88 $\pm$ 0,05	3,70 $\pm$ 0,02	4,00 $\pm$ 0,07	3,53 $\pm$ 0,01
Albumina (g/dL)	2,80 $\pm$ 0,02	2,70 $\pm$ 0,02	2,66 $\pm$ 0,01	2,53 $\pm$ 0,01
AST (U/L)	79,60 $\pm$ 4,87	67,50 $\pm$ 0,75	70,67 $\pm$ 1,53	52,67 $\pm$ 0,62
ALT (U/L)	32,80 $\pm$ 1,21	27,00 $\pm$ 0,86	34,67 $\pm$ 0,17	24,00 $\pm$ 0,78

**Anexo 4.** Concentração plasmática de glicose, colesterol total, triglicerídeos, ureia, creatinina, globulina, proteínas totais, albumina, AST e ALT dos camundongos após o tratamento diário consecutivo por 90 dias com ração padrão e farinha de folhas de *P. aculeata*. Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM), dos grupos experimentais tratados com ração padrão (CN), 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% de inclusão de farinha de *P. aculeata* (FPA 20%) - (ANOVA com pós-teste de Tukey).

PARÂMETROS BIOQUÍMICOS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CN	FPA 5%	FPA 10%	FPA 20%
	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M
Glicose (mg/dL)	151,00 $\pm$ 2,74	138,40 $\pm$ 2,65	122,40 $\pm$ 5,94	119,20 $\pm$ 4,15
Colesterol Total (mg/dL)	125,00 $\pm$ 7,43	110,00 $\pm$ 0,78	109,2 $\pm$ 2,12	92,60 $\pm$ 3,42
Triglicerídeos (mg/dL)	184,00 $\pm$ 19,93	112,80 $\pm$ 5,17	142,80 $\pm$ 8,37	115,00 $\pm$ 6,01
Ureia (mg/dL)	46,40 $\pm$ 1,61	36,20 $\pm$ 1,43	41,20 $\pm$ 0,70	48,20 $\pm$ 1,17
Creatinina (mg/dL)	0,51 $\pm$ 0,01	0,78 $\pm$ 0,12	0,92 $\pm$ 0,13	1,63 $\pm$ 0,09
Globulina (U/L)	2,14 $\pm$ 0,06	1,82 $\pm$ 0,08	1,92 $\pm$ 0,02	1,98 $\pm$ 0,00
Proteínas Totais (g/dL)	4,96 $\pm$ 0,09	4,48 $\pm$ 0,11	4,76 $\pm$ 0,05	4,62 $\pm$ 0,06
Albumina (g/dL)	2,82 $\pm$ 0,03	2,64 $\pm$ 0,01	2,84 $\pm$ 0,03	2,66 $\pm$ 0,19
AST (U/L)	67,40 $\pm$ 3,21	68,00 $\pm$ 3,20	71,60 $\pm$ 1,79	110,0 $\pm$ 5,11
ALT (U/L)	31,00 $\pm$ 2,39	28,80 $\pm$ 2,18	37,60 $\pm$ 2,05	49,80 $\pm$ 5,06

**Anexo 5.** Leucograma de camundongos após o tratamento consecutivo por 90 dias com ração padrão e farinha de folhas de *P. aculeata* em diferentes níveis. Os resultados dos grupos experimentais (n=10) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) no Controle negativo (CN), 5% (FPA 5%), 10% (FPA 10%) e 20% de inclusão de farinha de *P. aculeata* (FPA 20%) - (ANOVA com pós-teste de Tukey).

PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS	GRUPOS EXPERIMENTAIS			
	CN	FPA 5%	FPA 10%	FPA 20%
	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M
<b>Leucócitos (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	527,40 $\pm$ 21,90	420,00 $\pm$ 30,88	305,20 $\pm$ 17,51	299,60 $\pm$ 24,57
<b>Neutrófilos (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	12,80 $\pm$ 1,12	6,00 $\pm$ 0,74	11,80 $\pm$ 0,98	6,20 $\pm$ 0,56
<b>Linfócitos (<math>10^3/\mu\text{L}</math>)</b>	85,20 $\pm$ 1,64	92,20 $\pm$ 0,88	88,00 $\pm$ 0,91	93,80 $\pm$ 0,56

**Anexo 6.** Massa absoluta dos órgãos fígado, rins, coração, estômago e baço de camundongos após o tratamento consecutivo por 30 dias com farinha de *P. aculeata* nos diferentes níveis de inclusão, Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) - (ANOVA com pós-teste de Tukey).

ÓRGÃOS (g)	GRUPOS EXPERIMENTAIS (30 dias)			
	CN	FPA 5%	FPA 10%	FPA 20%
	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M
<b>Fígado</b>	1,05 $\pm$ 0,07	1,14 $\pm$ 0,05	1,18 $\pm$ 0,09	1,57 $\pm$ 0,09
<b>Rins</b>	0,35 $\pm$ 0,05	0,39 $\pm$ 0,00	0,35 $\pm$ 0,01	0,40 $\pm$ 0,02
<b>Coração</b>	0,18 $\pm$ 0,03	0,15 $\pm$ 0,01	0,14 $\pm$ 0,00	0,16 $\pm$ 0,01

**Anexo 7.** Massa absoluta dos órgãos fígado, rins, coração, estômago e baço de camundongos após o tratamento consecutivo por 90 dias com farinha de *P. aculeata* nos diferentes níveis de inclusão. Os resultados dos grupos experimentais (n=15) foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) - (ANOVA com pós-teste de Tukey).

ÓRGÃOS (g)	GRUPOS EXPERIMENTAIS (90 dias)			
	CN	FPA 5%	FPA 10%	FPA 20%
	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M	Média $\pm$ E.P.M
<b>Fígado</b>	1,39 $\pm$ 0,08	1,31 $\pm$ 0,08	1,07 $\pm$ 0,16	1,12 $\pm$ 0,05
<b>Rins</b>	0,40 $\pm$ 0,02	0,47 $\pm$ 0,02	0,38 $\pm$ 0,02	0,39 $\pm$ 0,02
<b>Coração</b>	0,19 $\pm$ 0,00	0,19 $\pm$ 0,00	0,14 $\pm$ 0,00	0,15 $\pm$ 0,00