

UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E
GENOTÓXICO DO ÓLEO EXTRAÍDO DA POLPA DA**
Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. Ex Mart.

GISELI KARENINA TRAESEL

DOURADOS
2014

GISELI KARENINA TRAESEL

**AVALIAÇÃO DO PERFIL TOXICOLÓGICO E
GENOTÓXICO DO ÓLEO EXTRAÍDO DA POLPA DA
Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. Ex Mart.**

Dissertação apresentada à Universidade Federal da Grande Dourados – Faculdade de Ciências da Saúde, para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Farmacologia e Toxicologia

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Arielle Cristina Arena

Co-orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Silvia Aparecida Oesterreich

**DOURADOS
2014**

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	v
Lista de Tabelas.....	vii
Lista de Abreviaturas.....	ix
Resumo.....	xi
Abstract.....	xii
1. INTRODUÇÃO.....	01
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	03
2.1. Plantas Medicinais.....	03
2.2. Bioma Cerrado.....	04
2.3. <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq.) Lodd. Ex Mart.....	04
2.3.1. Características Taxonômicas e Botânicas.....	05
2.3.2. Nomes Populares.....	09
2.3.3. Distribuição Geográfica.....	09
2.3.4. Usos da Espécie.....	10
2.3.4.1. Usos da Polpa.....	11
2.3.5. Composição Química e Nutricional.....	12
2.3.5.1. Compostos Antioxidantes.....	13
2.3.5.2. Ácidos Graxos Monoinsaturados.....	14
2.4. Estudos Toxicológicos.....	15
2.4.1. Ensaios Pré-Clínicos.....	15
2.4.1.1. Toxicidade Aguda.....	16
2.4.1.2. Toxicidade Subaguda.....	19
2.4.2. Ensaios de Genotoxicidade.....	21
2.4.2.1. Teste do Micronúcleo.....	22
2.4.2.1. Ensaio Cometa <i>Single Cell Gel Electrophoresis</i> (SCGE).....	24
3. OBJETIVOS.....	26
4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27
5. ANEXOS.....	37
5.1. Artigo para a Revista <i>Phytotherapy Research</i>	37
5.2. Critérios para publicação do periódico indicado.....	58

5.3. Artigo para a Revista <i>Human & Experimental Toxicology</i>	63
5.4. Critérios para publicação do periódico indicado.....	88
5.5. Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais.....	96
5.6. Dados não mostrados nos artigos.....	97

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Vista geral da palmeira *Acrocomia aculeata* (A); Vista geral da copa da palmeira (B) (Fonte: Nucci, 2007).....07
- Figura 2.** Tronco apresentando nós e espinhos escuros (A); Visão aproximada (B) (Fonte: Nucci, 2007).....07
- Figura 3.** Visão geral da copa da palmeira apresentando aspecto plumoso (A); Visão da folha de bocaiúva (B) (Fonte: Nucci, 2007).....08
- Figura 4.** Cacho com frutos de bocaiúva (A); Bocaiúva produzindo vários cachos de frutos (B) (Fonte: Nucci, 2007).....08
- Figura 5.** Estrutura dos frutos da bocaiúva (Fonte: Nucci, 2007).....09
- Figura 6.** Distribuição da espécie *A. aculeata* pela América Tropical (Fonte: Nucci, 2007).....10
- Figura 7.** Comparação entre capacidade de produção de óleo vegetal entre algumas oleaginosas (Fonte: Nucci, 2007).....12
- Figura 8.** Eritrócito policromático com micronúcleo (A). Eritrócito policromático sem micronúcleo (B). Eritrócito normocromático (C) (Fonte: Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003).....23
- Figura 9.** Classificação dos cometas em células de sangue periférico no ensaio SCGE. Classe 0 (A); Classe 1 (B); Classe 2 (C) e Classe 3 (D) (Fonte: Freitas, 2007).....25
- Figura 10.** Histopatologia do fígado de ratos tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) e respectivo controle (H&E x 100). (A) Grupo Controle Negativo sem alterações. Visualização de veias centro lobulares à esquerda e espaço porta à direita. (B) Grupo OPAC 1000 mg/kg também sem alterações.....105
- Figura 11.** Histopatologia do rim de ratos tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) e respectivo controle (H&E x 100). (A) Grupo Controle Negativo sem alterações. Visualização de túbulos e glomérulos. (B) Grupo OPAC 1000 mg/kg também sem alterações.....106
- Figura 12.** Histopatologia do pulmão de ratos tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) e respectivo controle (H&E x 100). (A) Grupo Controle Negativo sem alterações. Visualização de um bronquíolo e uma pequena artéria. (B) Grupo OPAC 1000 mg/kg com visualização de um foco de infiltrado inflamatório perivascular, lesão

espontânea não significativa.....107

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1. <i>Screening</i> hipocrático para avaliação animal após exposição aguda e subaguda (Fonte: Malone & Robichaud, 1962).....	18
--	----

Primeiro Artigo

Tabela 1. Consumo de água, ração e evolução ponderal das ratas tratadas com o óleo extraído da polpa da <i>A. aculeata</i> (OPAC) após exposição aguda e respectivo controle.....	55
Tabela 2. Consumo de água, ração e evolução ponderal dos ratos fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo extraído da polpa da <i>A. aculeata</i> (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.....	56

Segundo Artigo

Tabela 1. Número de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCEs) e razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCE/NCE) observados em células do sangue periférico de ratos <i>Wistar</i> fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo da polpa da <i>Acrocomia aculeata</i> (OPAC). Para cada tempo de amostra (48 e 72 h) foram analisadas 2.000 células.....	86
Tabela 2. Índice e Frequência de dano ao DNA no ensaio cometa observados em leucócitos de ratos <i>Wistar</i> fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo da polpa da <i>Acrocomia aculeata</i> (OPAC). Para cada tempo de amostra (4 e 24 h) foram analisadas 100 células.....	87

Dados não mostrados nos artigos

Tabela 1. Peso absoluto (g) e relativo (g/100g) dos órgãos das ratas tratadas com o óleo extraído da polpa da <i>A. aculeata</i> (OPAC) após exposição aguda e respectivo controle.....	97
Tabela 2. Peso absoluto (g) e relativo (g/100g) dos órgãos dos ratos fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo extraído da polpa da <i>A. aculeata</i> (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.....	98

Tabela 3. Peso absoluto (g) e relativo (g/100g) dos órgãos reprodutivos das ratas fêmeas (útero e ovário direito) e ratos machos (testículo direito, epidídimo direito, ducto deferente direito e próstata) tratados com o óleo extraído da polpa da <i>A. aculeata</i> (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.....	100
Tabela 4. Parâmetros bioquímicos no soro dos ratos fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo extraído da polpa da <i>A. aculeata</i> (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.....	101
Tabela 5. Parâmetros hematológicos dos ratos fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo extraído da polpa da <i>A. aculeata</i> (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.....	103

LISTA DE ABREVIATURAS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de Variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CG	Cromatografia gasosa
DL50	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de massas
ERO	Espécie reativa de oxigênio
GGT	Gama-glutamyltranspeptidase
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCl	Ácido Clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IC	Ionização de chama
KOH	Hidróxido de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOAEL	Menor dose com efeito adverso observado
LOEL	Menor dose com efeito observado
LPM	Baixo ponto de fusão
MgSO ₄	Sulfato de magnésio
MCN	Micronúcleo
MNPCE	Eritrócito policromático micronucleado
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio
NCE	Eritrócito Normocromático
NOAEL	Dose de efeito adverso não observado
NOEL	Dose de efeito não observado
OECD	Organisation for Economic Cooperation and Development

OMS	Organização Mundial da Saúde
OPAC	Óleo extraído da polpa da <i>Acrocomia aculeata</i>
PCE	Eritrócito policromático
RBC	Eritrócitos
RDW	Largura da distribuição dos eritrócitos
SCGE	Células únicas em gel de eletroforese
WBC	Leucócitos

RESUMO

A *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. é uma palmeira nativa das florestas tropicais, sendo encontrada em abundância no Cerrado brasileiro. A polpa do seu fruto é rica em ácidos graxos monoinsaturados, sendo o ácido oleico o componente majoritário. Possui também elevados teores de carotenoides e tocoferóis, o que explica suas propriedades alimentícias e uso etnofarmacológico. Devido à escassez de estudos toxicológicos, o presente trabalho teve como objetivo avaliar o perfil toxicológico da *A. aculeata* através de testes de toxicidade pré-clínicos (toxicidade aguda e subaguda) e genotóxicos (ensaio cometa e teste do micronúcleo). Ratos *Wistar*, machos e fêmeas, receberam por gavagem 2000 mg/kg do óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) para o teste de toxicidade aguda; 125, 250, 500 e 1000 mg/kg do OPAC para o teste de toxicidade subaguda e 125, 250, 500, 1000 e 2000 mg/kg do OPAC para o ensaio cometa e micronúcleo. Os resultados mostraram que o óleo da bocaiúva não induziu toxicidade sistêmica e em nenhum órgão-alvo nos animais após os testes de toxicidade pré-clínicos, uma vez que não foram observadas alterações importantes nos parâmetros comportamentais, histológicos e hemato-bioquímicos. A DL50 foi fixada acima de 2000 mg/kg. Nos testes de genotoxicidade o óleo também não induziu aumentos de danos ao DNA nas células de sangue periférico de ratos, em comparação com o controle negativo. Deste modo, conclui-se que, nas doses utilizadas no presente estudo, o óleo da *A. aculeata* não apresentou efeitos tóxicos após exposição aguda e subaguda em ratos fêmeas e machos adultos, garantindo a manutenção do uso na medicina popular.

Palavras-chave: DL50; *Acrocomia aculeata*; toxicidade aguda; toxicidade subaguda; genotoxicidade.

ABSTRACT

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart. is a palm native of tropical forests, found in abundance in the Brazilian Cerrado. The pulp of the fruit is rich in monounsaturated fatty acids, being the oleic acid the major component. It also has high levels of carotenoids and tocopherols, which explains its nutritional properties and ethnopharmacological use. Due to the lack of toxicological studies, the present study aimed to evaluate the toxicological profile of *A. aculeata* through preclinical toxicity tests (acute and subacute toxicity) and genotoxic (comet assay and micronucleus test). *Wistar* rats, male and female, received by gavage 2000 mg/kg of the oil extracted from the pulp of *A. aculeata* (OPAC) for the acute toxicity test, 125, 250, 500 and 1000 mg/kg of OPAC for the subacute toxicity test and 125, 250, 500, 1000 and 2000 mg/kg of OPACs for the comet and micronucleus assay. The results demonstrated that the oil of bocaiuva did not induce either systemic or target-organ toxicity in animals after preclinical toxicity test, since significant changes were not observed in behavioral, histological and biochemical parameters. The LD50 was fixed above 2000 mg/kg. In the genotoxicity tests the oil did not induce DNA damage increases in peripheral blood cells of rats, as compared to the negative control. Thus, we conclude that at the doses used in this study, *A. aculeata* oil showed no toxic effects after acute and subacute, ensuring the maintenance of use in folk medicine.

Keywords: LD50; *Acrocomia aculeata*; acute toxicity; subacute toxicity; genotoxicity.

1. INTRODUÇÃO

Em países em desenvolvimento, 65 a 80% da população faz uso de plantas medicinais ou preparações feitas a partir destas para o tratamento de diversas doenças (WHO, 2002). Tendo em vista a grande aceitação no uso de plantas medicinais pela população, bem como os efeitos biológicos que estas produzem no organismo humano (Silva, 2010), torna-se de grande relevância estudos científicos de validação da utilização popular em relação à eficácia e segurança (Melo *et al.*, 2011).

Devido a diversidade de plantas e seus possíveis efeitos benéficos ao organismo, essas são potenciais alvos de estudos de novas moléculas ativas. Isso ocorre, principalmente, com as plantas superiores, as quais têm sido fontes de novos compostos com atividades farmacológicas. Os medicamentos fitoterápicos há muito têm sido de grande utilidade terapêutica por serem de fácil acesso ao ser humano. No entanto, ainda poucas plantas foram estudadas química, toxicológica ou farmacologicamente (Reyes-Garcia, 2010; Melo *et al.*, 2011).

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart., conhecida popularmente como bocaiúva ou macaúba, é uma planta que possui vasta abrangência geográfica, podendo ser encontrada em abundância no Cerrado brasileiro. É uma palmeira que atinge até 15 metros de altura e possui frutos verde amarelados esféricos comestíveis, e de aroma agradável (Lorenzi, 2006). A polpa obtida do seu fruto é rica em ácido oleico (Ramos *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2011; Mariano *et al.*, 2011) e compostos antioxidantes, principalmente β -caroteno e α -tocoferol (Coimbra & Jorge, 2011).

Esta planta é amplamente utilizada pela população para diversos fins. Tratando-se de sua polpa, há relatos de uso alimentício (Lorenzi, 2006; Nucci, 2007; Ramos *et al.*, 2008); cosmético (Silva, 2012); na geração de combustível (Moura *et al.*, 2009) e na medicina popular. Para fins medicinais é comumente usada como fortificante (Lorenzi, 2006), analgésico - em especial para dores de cabeça e nevralgias - (Lorenzi, 2006), como hipocolesterolêmico (Ramiro, 2010), como hipoglicemiante (Silva, 2012), como laxante (Almeida, 1998) e para o tratamento das afecções das vias respiratórias (Almeida, 1998).

Considerando o potencial terapêutico descrito para a polpa da *A. aculeata*, e a falta de estudos que determinem a ação tóxica desta espécie, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o perfil toxicológico em modelos experimentais de toxicidade aguda, toxicidade subaguda, teste do micronúcleo e ensaio cometa. Essas informações poderão contribuir para a utilização dessa espécie na medicina tradicional de forma segura, ao mesmo tempo em que dá suporte para testes de atividades farmacológicas.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Plantas Medicinais

Há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos da natureza para o tratamento de diversas doenças (Pinto, Amorozo & Furlan, 2006; Silva, 2010). Existem relatos do uso de plantas com finalidades terapêuticas 3.000 a.C. na obra *Pen Ts'ao* do chinês Shen Nung. No ano 78 d.C., o botânico grego Pedanios Dioscorides descreveu cerca de 600 espécies medicinais no tratado *De Materia Medica* (Turolla & Souza, 2006).

Através da observação e da experimentação pelos povos antigos é que as propriedades terapêuticas de muitas plantas foram sendo descobertas e propagadas de geração em geração (Turolla & Souza, 2006). Dessa forma, o uso de plantas medicinais foi estabelecendo-se na cultura popular e intensificando-se com o passar do tempo (WHO, 2002; Oliveira *et al.*, 2011).

A Organização Mundial de Saúde aponta que 65 a 80% da população que vive em países em desenvolvimento depende essencialmente de plantas medicinais para os cuidados de saúde primários (WHO, 2002). Em países desenvolvidos, o uso se torna mais evidente naqueles aonde existem diretrizes apropriadas para o registro de fitoterápicos, como, por exemplo, Alemanha, França, Itália e Estados Unidos (Brevoort, 1995).

Estima-se que em torno de 20% das espécies da flora mundial podem ser encontradas no Brasil, estando distribuídas em diversas regiões fitogeográficas, como Floresta Atlântica, Floresta Amazônica, Pampas, Cerrado, Caatinga e Pantanal, sendo o Brasil considerado o país com maior biodiversidade do planeta (Calixto, 2003; Melo *et al.*, 2011).

A área de pesquisa de medicamentos fitoterápicos está aumentando e com isso a busca por novas substâncias ativas provenientes de produtos naturais está se intensificando (Matta *et al.*, 2011). Neste sentido, o Cerrado é bastante interessante, já que é conhecido por possuir uma extensa flora e fauna, bem como pelas culturas populares presentes, que englobam diferentes origens étnicas e que são usuárias destes recursos naturais.

2.2. Bioma Cerrado

O Cerrado brasileiro é reconhecido como uma das 25 áreas mundiais prioritárias para bioconservação e como a savana mais rica do mundo em biodiversidade. Este bioma ocupa cerca de 22% do território nacional, em uma área de 2.036.448 km² e percorre 14 estados brasileiros, sendo a região Centro-Oeste a de maior predominância (Roesler *et al.*, 2007; Ribeiro & Walter, 2008). Faz fronteira com Amazônia, Mata Atlântica, Caatinga e Pantanal. Esta região possui flora nativa composta por 11.627 espécies vegetais catalogadas e 1.600 espécies de animais (Klink & Machado, 2005).

Este bioma é composto de dois estratos principais, um superior formado por árvores de até 20 metros e arbustos com raízes profundas; e um inferior, composto por um tapete de gramíneas rasteiras, com raízes pouco profundas. O clima é composto por duas estações principais, uma quente e seca e outra úmida e chuvosa (IBAMA, 2008).

Uma grande variedade de plantas do Cerrado é utilizada pela população de diversas formas: alimentação, artesanato, fabricação de bebidas, recuperação de solos degradados, proteção contra a erosão, e, muitas vezes, para uso terapêutico (Silva *et al.*, 2008). Estima-se que mais de 220 espécies nativas do Cerrado são utilizadas com fins medicinais (Oliveira *et al.*, 2011).

Dentre as espécies tidas como maiores fontes de recursos naturais do Cerrado destacam-se os frutos oleaginosos (Hiane & Penteado, 1989). A importância de tais frutos é decorrente da sua composição química - rica em ácidos graxos monoinsaturados - e das propriedades relacionadas a essa composição - manutenção do HDL colesterol e consequente prevenção de doenças cardiovasculares (Rajaram *et al.*, 2001). Entre os frutos oleaginosos presentes no Cerrado brasileiro destacam-se o pequi, o buriti, o araticum, o baru, a cagaita, a guavira (Hiane & Penteado, 1989) e, ainda, o objeto do nosso estudo, a bocaiúva.

2.3. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart.

A família *Arecaceae* é formada por um grupo de espécies conhecidas genericamente como palmeiras. Os botânicos as denominavam de “príncipe das

florestas”, dado seu porte altaneiro e elegante, o que as distingue facilmente de outras plantas (Lorenzi, 2006). Dentre as palmeiras encontradas no território nacional podem-se destacar as mais conhecidas, como o dendezeiro (*Elaios guineensis*), o açazeiro (*Euteropole oleracea*), o coqueiro da Bahia (*Cocos syagnus*) e o macaubeiro (*Acrocomia aculeata*).

O gênero *Acrocomia* é composto por duas únicas espécies – *aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. e *hassleri* (B. Rodr.) W. J. Hahn. As duas espécies diferem basicamente pelo tamanho dos indivíduos e pela localização geográfica. A *A. aculeata* é de maior porte e está amplamente distribuída na América Tropical, enquanto que a *A. hassleri* é menor e está restrita à região de cerrado no Brasil e Paraguai (Henderson, Galeano & Bernal, 1995). O termo *Acrocomia* tem origem grega e descreve a forma como as folhas estão dispostas na planta. “*Akron*” (cima) e “*Kome*” (cabeleira) sugerem que as folhas estão dispostas no formato de uma coroa (Novaes, 1952; Henderson, Galeano & Bernal, 1995).

A espécie *A. aculeata* foi primeiramente descrita por Jacquin em 1763 tendo como basônimo *Cocos aculeatus* Jacq. Foi inserida por Martius no gênero *Acrocomia*, em 1824, sendo designada então como *Acrocomia sclerocarpa*, e, posteriormente, em 1845, Loddiges coloca ambos em sinonímia, designando-a como *Acrocomia aculeata* (MOBOT, 2006).

2.3.1. Características Taxonômicas e Botânicas

Em termos taxonômicos, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. está classificada em:

- Reino: Plantae
- Divisão: Magnoliophyta
- Classe: Liliopsida
- Subclasse: Arecidae
- Ordem: Arecales
- Família: Arecaceae
- Subfamília: Arecoideae
- Tribo: Cocoeae

- Subtribo: Bactridinae
- Gênero: *Acrocomia*
- Espécie: *Acrocomia aculeata* (Lorenzi, 2006).

A palmeira bocaiúva apresenta caule simples e cilíndrico e pode atingir de 10 a 15 metros de altura (Figura 1). O tronco possui diâmetro de 20 a 30 cm, apresentando nós e espinhos escuros com cerca de 10 cm de comprimento (Figura 2). As raízes podem ser subterrâneas ou aéreas. As folhas apresentam quatro a cinco metros de comprimento, geralmente em número de 20 a 30, coloração verde escuro, distribuídas em diferentes planos dando um aspecto plumoso à copa (Figura 3) (Lorenzi, 1992; Tassaró, 1996; Lorenzi, 2006; MOBOT, 2006).

A frutificação se dá após quatro a seis anos do plantio e ocorre durante todo o ano, porém o amadurecimento dos frutos acontece, em geral, entre setembro e março. A palmeira produz em média de dois a oito cachos, com cerca de 400 frutos por cacho, numa média anual de 70 a 80 kg de cocos (Figura 4) (Scariot, Lleras & Hay, 1995).

Os frutos se apresentam de forma esférica, com epicarpo (casca) de coloração verde-amarelado, com diâmetro variando de 2,5 a 5 cm. O epicarpo rompe-se facilmente quando maduro. O mesocarpo (polpa) tem característica fibrosa, rico em glicerídeos e carotenoides, com sabor adocicado, de coloração marrom-amarelada em frutos maduros e amarelo-esbranquiçado em frutos verdes. Trata-se de um fruto comestível e de aroma agradável (Lorenzi, 2006). Cada fruto contém uma amêndoa oleaginosa, comestível e revestida de uma fina camada de tegumento (Figura 5) (Scariot, Lleras & Hay, 1991; Lorenzi, 1992).



Figura 1. Vista geral da palmeira *Acrocomia aculeata* (A); Vista geral da copa da palmeira (B) (Fonte: Nucci, 2007).



Figura 2. Tronco apresentando nós e espinhos escuros (A); Visão aproximada (B) (Fonte: Nucci, 2007).



Figura 3. Visão geral da copa da palmeira apresentando aspecto plumoso (A); Visão da folha de bocaiúva (B) (Fonte: Nucci, 2007).



Figura 4. Cacho com frutos de bocaiúva (A); Bocaiúva produzindo vários cachos de frutos (B) (Fonte: Nucci, 2007).

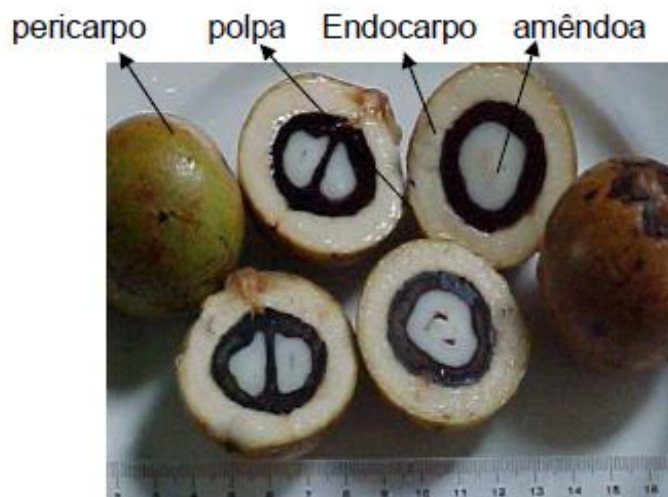


Figura 5. Estrutura dos frutos da bocaiúva (Fonte: Nucci, 2007).

2.3.2. Nomes populares

A *A. aculeata* é uma espécie que possui diversos nomes populares, dependendo da região de distribuição da planta, os quais são descritos a seguir: Mbocayá (Argentina); totaí (Bolívia); tamaco (Colômbia); coyol (Costa Rica, Honduras, México); corosse (Haiti). Também se registram como nomes populares desta espécie: macaw palm, macaya, groogroo, grugrupalm, mbocayá, cobrush, coquito, mocayá, catey, cayara, cayiete, ocori, palma de vino, gri-gri, mucajá, grou gro (MOBOT, 2006). No Brasil, esta espécie também apresenta uma vasta sinonímia popular, destacando-se: bocaiúva, macaúba, macacauba, macaiba, macaibeira, macajuba, macaúva, mucaia, mucaja e mucajaba, chiclete-de-baiano, coco-baboso, coco-de-catarro, coco-de-espinho (Lorenzi, 1992; Teixeira, 2005; Moura *et al.*, 2009).

2.3.3. Distribuição Geográfica

A *A. aculeata* habita áreas abertas e com alta incidência de luz solar. Adapta-se a solos arenosos e com baixo índice hídrico, mas desenvolve-se melhor em locais com solos férteis. Tem ampla distribuição geográfica e tem preferência por regiões com estação chuvosa bem definida e de baixas altitudes (Lorenzi, 2006; MOBOT, 2006). Ocorre em todo o continente americano, do sul do México a Argentina, Bolívia,

Paraguai, Antilhas, Colômbia, exceto Equador e Peru (Henderson, Galeano & Bernal, 1995; Motta *et al.*, 2002). Há registros de sua ocorrência nos Andes Colombianos cuja altitude é de 1200 metros.

No Brasil ocorrem povoamentos naturais em quase todo território, estendendo-se do Pará até São Paulo, Rio de Janeiro e região Centro-Oeste. As maiores concentrações estão localizadas em Minas Gerais, Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul, sendo amplamente espalhados pelas áreas de Cerrado (Figura 6) (Henderson, Galeano & Bernal, 1995).



Figura 6. Distribuição da espécie *A. aculeata* pela América Tropical (Fonte: Nucci, 2007).

2.3.4. Usos da Espécie

Lima e col. (2013) destacam a importância das palmeiras do ponto de vista natural, econômico e ecológico. São comumente utilizadas como alimento pelo homem, na forma de palmitos, frutos e até mesmo produtos elaborados como doces, bebidas e óleos.

O estipe é utilizado em construções rurais, na confecção de ripas, mourões, estacas e calhas para água. Da medula do estipe obtém-se uma fécula nutritiva, utilizada como alimento. A seiva é empregada na confecção de vinhos e para fins medicinais, no

controle de febres. O meristema apical é consumido na forma de palmito (Lorenzi, 2006).

As folhas são utilizadas para fins forrageiros, artesanais e fornecimento de fibras têxteis, enquanto que as fibras são empregadas na confecção de chapéus, balaios, linhas de pesca e redes. As raízes são empregadas com finalidades terapêuticas (relatos de efeito diurético e hipotensor) e os espinhos são utilizados como substitutos de agulhas de coser (Lorenzi, 2006).

O fruto é a parte mais importante da planta. Dele se pode explorar a polpa, a amêndoa e a semente. A semente (parte lignificada) é empregada como substituto da brita no concreto, como matéria-prima para a confecção de botões e também para a produção de combustível (Lorenzi, 2006).

A amêndoa tem relatos de uso alimentício (coquinho, paçoca e substituto do óleo de cozinha); cosmético (hidrante capilar); medicinal (laxante); combustível (em lamparinas e na produção de biodiesel) e ainda como ingrediente na produção de sabão (Lorenzi, 2006). O óleo extraído da amêndoa é claro, fino e transparente, rico em ácido láurico e ácido oleico (Hiane *et al.*, 2005), com qualidades semelhantes ao da oliveira (Lorenzi, 1992).

2.3.4.1. Usos da Polpa

A polpa da bocaiúva é amplamente utilizada pela população do cerrado e possui diversos tipos de uso. Dentre as utilizações com fins alimentícios, pode-se destacar tanto o consumo *in natura* quanto o uso da polpa no processamento de bolos, doces, paçocas, geleias, cocadas, goma de mascar, licor e sorvetes (Lorenzi, 2006). Ela é também empregada na dieta como fonte complementar de nutrientes essenciais (Ramos *et al.*, 2008). O óleo de soja utilizado na culinária pode ser substituído pelo óleo da bocaiúva, e os resíduos gerados podem ser usados na produção de ração para suínos, aves e caprinos (Nucci, 2007).

Tratando-se de finalidades medicinais, há relatos do uso da polpa como fortificante (Lorenzi, 2006); como analgésico - em especial para dores de cabeça e nevralgias - (Lorenzi, 2006); como hipocolesterolêmico (Ramiro, 2010; Aouqi, 2012);

como hipoglicemiante (Silva, 2012); como laxante (Almeida, 1998) e ainda para o tratamento das afecções das vias respiratórias - o que lhe valeu a denominação coco-de-catarro (Almeida, 1998).

Para finalidades cosméticas, o óleo da polpa é utilizado como hidratante capilar e retardador do envelhecimento cutâneo (Silva, 2012). Na indústria, pode ser empregado tanto em saboarias (Carvalho, 2010) como na produção de combustível (Lorenzi, 2006).

No Brasil, o óleo da bocaiúva é considerado importante fonte de óleo vegetal com potencial para produção de biodiesel devido a alta produtividade dessa palmeira quando comparada a outras oleaginosas (Figura 7). Os frutos da bocaiúva podem gerar uma média de 1500 a 5000 kg de óleo por hectare por ano (Teixeira, 2005; Moura *et al.*, 2009). A polpa apresenta potencial energético duas vezes superior ao buriti e cerca de três vezes superior a outros frutos regionais como o caraguatá, pitanga, araticum, araçá e tarumã (Caldeira *et al.*, 2004).

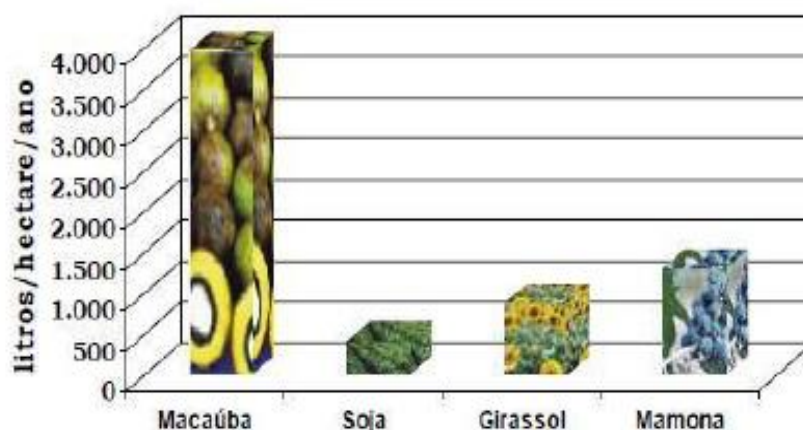


Figura 7. Comparação entre capacidade de produção de óleo vegetal entre algumas oleaginosas (Fonte: Nucci, 2007).

2.3.5. Composição Química e Nutricional

Os frutos do cerrado apresentam, em geral, elevados teores de açúcares, proteínas, sais minerais, ácidos graxos, vitaminas do complexo B e carotenoides (Silva *et al.*, 2008). Na polpa da bocaiúva, ressaltam-se duas características essencialmente

importantes: a presença de compostos antioxidantes e óleo de altíssima qualidade (Hiane *et al.*, 2005; Faria, 2010).

2.3.5.1. Compostos Antioxidantes

Os radicais livres têm papel importante nas reações bioquímicas e fisiológicas do organismo. No entanto, havendo produção excessiva, eles se tornam responsáveis pelo envelhecimento e por doenças degenerativas associadas ao envelhecimento, como câncer, doenças cardiovasculares, catarata, declínio do sistema imune e distúrbios neurológicos (Gama & Sylos, 2007).

A produção de radicais livres nos seres vivos é controlada por diversos compostos antioxidantes, os quais podem ter origem endógena ou ser proveniente de fonte alimentar. De origem exógena, destacam-se tocoferóis (vitamina E), ácido ascórbico (vitamina C), polifenóis, selênio e carotenoides (Omoni & Aluko, 2005). Os antioxidantes são capazes de estabilizar ou desativar os radicais livres antes que ataquem os alvos biológicos celulares (Barreiros, David & David, 2006).

A designação vitamina E é dada a um grupo de compostos antioxidantes lipossolúveis, entre os quais o α -tocoferol é a forma mais ativa. É encontrada em lipoproteínas e membranas, atuando no bloqueio da reação em cadeia da peroxidação lipídica, através do sequestro do radical peroxila (Omoni & Aluko, 2005).

Coimbra & Jorge (2011) determinaram os valores de tocoferóis do óleo da polpa da bocaiúva, através de cromatografia líquida de alta eficiência. Em relação aos tocoferóis totais, foi encontrado valor de $212,95 \pm 0,64$ mg/kg do óleo. O α -tocoferol foi predominante no óleo analisado ($143,70 \pm 1,13$ mg/kg - 67%), sendo encontrado também o γ -tocoferol ($57,85 \pm 0,35$ mg/kg), o δ -tocoferol ($8,15 \pm 0,07$ mg/kg) e o β -tocoferol ($3,25 \pm 0,21$ mg/kg).

Os carotenos protegem os lipídeos dos danos peroxidativos inativando o oxigênio através da reação com os radicais peroxila, hidroxila e superóxido. O β -caroteno é o precursor natural da vitamina A, vitamina que além da função nutricional está relacionada à visão, ao crescimento ósseo e a diferenciação de tecidos (Siqueira *et al.*, 2007).

Ramos e col. (2008) determinaram os teores dos principais carotenoides da polpa de bociáúva, através de cromatografia líquida de alta eficiência. A análise da polpa apontou alta concentração de β -caroteno ($49,0 \pm 2,0$ mg/kg), correspondendo a 80% dos carotenoides totais encontrados. Hiane e Penteadó (1989) também analisaram o perfil de carotenoides, mas através de cromatografia em coluna aberta. Os resultados apontaram altos valores para β -caroteno ($59,41 \pm 11,09$ mg/kg), sendo ele 89% predominante na polpa. Além disso, os autores afirmam que o β -caroteno da polpa da bociáúva é altamente biodisponível quando comparado ao β -caroteno puro.

2.3.5.2. Ácidos Graxos Monoinsaturados

Os lipídeos são de extrema importância na alimentação e no desenvolvimento humano, sendo responsáveis pelo fornecimento direto de ácidos graxos ao organismo. Sabe-se que os ácidos graxos desempenham diversas funções orgânicas, tais como: funções metabólicas; de reservas energéticas; formação de hormônios e sais biliares; transporte de vitaminas e função antioxidante (Philippi, 2008).

O óleo da polpa da bociáúva é composto majoritariamente de ácidos graxos monoinsaturados, com destaque para o ácido oleico (Hiane, Penteadó & Badolato, 1990; Hiane *et al.*, 2005; Ramos *et al.*, 2008; Amaral *et al.*, 2011; Mariano *et al.*, 2011).

As principais fontes dietéticas de ácidos graxos monoinsaturados são os óleos de oliva, canola e bociáúva, bem como os frutos oleaginosos amendoim, castanhas, nozes e amêndoas (Bergouignan *et al.*, 2009). O consumo de ácidos graxos monoinsaturados na dieta favorece a estabilidade do metabolismo do colesterol, pois contribui para redução do LDL colesterol, principal formador da placa aterogênica nos vasos sanguíneos, e manutenção dos níveis do HDL colesterol, que transporta o colesterol livre dos tecidos e sangue para o fígado para ser metabolizado e excretado pelo organismo. Portanto, o consumo desse tipo de ácido graxo está associado a menor incidência de infarto, arteriosclerose, hipertensão e acidente vascular cerebral ou periférico (Nagaraju & Lokesh, 2007; Philippi, 2008). Além disso, por apresentarem ação antioxidante, reduzem o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica (Ramos *et al.*, 2008; Bergouignan *et al.*, 2009).

2.4. Estudos Toxicológicos

2.4.1. Ensaio Pré-Clínicos

Muitas plantas com propriedades medicinais são utilizadas pela população baseado em conhecimentos empíricos (Calixto, 2000). Entretanto, somente o conhecimento popular é insuficiente para comprovar a segurança e a eficácia de uso de uma planta. Estudos de toxicidade são necessários para avaliar os níveis de toxicidade e efeitos adversos associados ao consumo (Silva *et al.*, 2012).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A Agência Nacional de Vigilância Sanitária vem elaborando normas para a regulamentação destes medicamentos. A portaria nº. 6 de 1995 estabeleceu prazos para que as indústrias farmacêuticas apresentassem dados de eficácia e segurança dos medicamentos fitoterápicos; a portaria nº. 18 de 2004 dispõe sobre os registros de medicamentos fitoterápicos e o guia publicado em 2013 trata de diversos testes pré-clínicos a serem realizados para o desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 1995; 2004; 2013).

A preocupação das autoridades regulatórias com a normatização de medicamentos fitoterápicos permite a avaliação de pontos importantes, como a eficácia e segurança do uso destes medicamentos. O uso tradicional de plantas medicinais baseado em conhecimento popular, aliado à crença de que produtos, quando naturais, não causam reações tóxicas, fez com que poucas plantas fossem de fato avaliadas através de estudos pré-clínicos (Turolla & Souza, 2006).

Os testes para avaliação de toxicidade das substâncias químicas estão bem detalhados segundo os protocolos sugeridos pela Organisation for Economic Cooperation and Development (OECD). No Brasil, a Resolução nº. 90, publicada em 2004, e o “Guia para a Condução de Estudos não clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos”, publicado em janeiro de 2013, apresentam normativas para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Tais documentos foram elaborados em conformidade com as normas da Organização Mundial da Saúde (OMS) e OECD, e recomendam estudos de toxicidade aguda e de doses repetidas (subaguda).

Os protocolos internacionalmente reconhecidos foram desenvolvidos por especialistas da área com a finalidade de dar credibilidade e segurança aos resultados dos diversos estudos toxicológicos. Os resultados de estudos desenvolvidos em conformidade com os protocolos permitem comparar, reproduzir, avaliar pontos relevantes e conferir uniformidade de tratamento para diferentes produtos (ANVISA, 2010).

2.4.1.1. Toxicidade Aguda

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária, estudos de toxicidade aguda são aqueles utilizados com o objetivo de avaliar a toxicidade produzida por uma substância teste quando essa é administrada em uma ou mais doses em um determinado período de tempo, seguido da observação em animais por 14 dias após a administração. Estudos de toxicidade aguda dão suporte e devem ser realizados anteriormente à Fase 1 da Pesquisa Clínica (ANVISA, 2013).

Os testes de toxicidade aguda permitem determinar a DL50 (dose letal média) de uma substância. A DL50 corresponde a dose da substância que se estima que cause a morte de 50% dos animais da pesquisa. Ela é calculada estatisticamente com base nos resultados obtidos nos testes e seu valor é expresso em termos de peso da substância teste por unidade de peso do animal testado (mg/kg) (OECD, 2008a).

A via de administração recomendada é aquela que é pretendida para consumo humano. No caso da via pretendida ser oral, preconiza-se a administração da substância teste via gavagem (ANVISA, 2013). A espécie animal de escolha é o rato, embora também possam ser utilizadas outras espécies de roedores. Recomenda-se a utilização de fêmeas, visto que a literatura aponta maior sensibilidade destas aos compostos testados, as quais devem ser saudáveis, nulíparas e não-prenhas, com idade compreendida entre 8 a 12 semanas (ANVISA, 2004; OECD 2008a).

Quando há informação indicativa de que o material de ensaio é de baixa toxicidade (com base em ensaios com compostos semelhantes, levando em consideração a composição química dos produtos testados), deve-se utilizar como limite do teste a dose de 2000 mg/kg. Neste caso, essa dose deve ser administrada a um único animal. Se o animal sobreviver, a mesma dose deve ser administrada sequencialmente a mais

quatro animais, em intervalos de aproximadamente 48 horas, de forma que um total de cinco animais seja testado. O intervalo de tempo dependerá do início e severidade dos sintomas tóxicos apresentados. Quando três ou mais animais do total de cinco sobrevivem, a DL50 é considerada superior a 2000 mg/kg. Quando há o óbito do primeiro animal, ou então três ou mais animais vão à óbito durante o tratamento, doses mais baixas devem ser testadas para que seja possível estabelecer a DL50 (OECD, 2008a).

Quando há pouca ou nenhuma informação sobre a toxicidade do produto, ou ainda que se espera que apresente algum nível de toxicidade, deve-se iniciar o tratamento com uma dose mais baixa. Para estabelecer a dose de partida, devem-se considerar todas as informações disponíveis tais como, informações gerais sobre a substância teste, resultados de quaisquer outros ensaios de toxicidade e resultados de ensaios com materiais estruturalmente relacionados. Com tais informações, estabelece-se uma estimativa de DL50. O primeiro animal será dosado com um nível abaixo da dose predita. Se o animal sobreviver, o segundo animal recebe uma dose mais elevada. Se o animal morrer ou apresentar sinais tóxicos, o segundo animal recebe uma dose mais baixa. O fator de progressão da dose deve ser escolhido e mantido constante ao longo do estudo. Usualmente, utiliza-se fator de 3,2 (sequência de 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750, 5000 mg/kg). Se nenhuma estimativa da letalidade da substância está disponível, a dosagem deve ser iniciada com 175 mg/kg (OECD, 2008a).

Os animais devem ser observados periodicamente durante as primeiras 24 horas após a administração da substância teste e, posteriormente, no mínimo uma vez ao dia durante 14 dias. Sinais de toxicidade, incluindo tempo de aparecimento, progressão e reversibilidade destes devem ser anotados. Os tempos nos quais os sinais aparecem e desaparecem são importantes, sobretudo se houver uma tendência para que eles apareçam tardiamente (ANVISA, 2004; OECD, 2008a; ANVISA, 2013).

Devem ser observados, diariamente, os parâmetros do *screening* hipocrático, sugeridos por Malone & Robichaud (1962), descritos na Tabela 1.

Tabela 1. *Screening* hipocrático para avaliação animal após exposição aguda e subaguda.

Parâmetro		Descrição
Estado consciente	Atividade geral	Verificar a locomoção dentro da caixa, bem como o ato de levantar e farejar do animal.
	Resposta ao toque	Tocar o animal por 15 segundos e examinar a resposta imediata dele.
Atividade e Coordenação do Sistema Motor e Tônus Muscular	Resposta ao aperto de cauda	Apertar a ponta da cauda do animal com pinça e observar a reação do mesmo.
	Endireitamento	Colocar o animal com o dorso para baixo e verificar a latência com que volta à posição normal.
	Força para agarrar	Colocar animal sobre grade e avaliar intensidade em que se segura na mesma.
	Tônus do corpo	Verificar sua presença ou não e o grau.
Reflexos	Auricular	Estalar os dedos e observar a posição da orelha após o estímulo.
	Corneal	Aproximar uma pinça até os olhos, sem tocá-los, e observar se o animal os fecha.
Atividades sobre o Sistema Nervoso Central	Tremores	Observar se estão presentes e qual intensidade.
	Convulsões	Observar a presença ou ausência.
	Cauda em straub	Verificar cauda em posição normal ou ereta.
	Sedação	Animal sem movimento, mas responde a estímulos.
	Anestesia	Animal sem movimento e sem resposta a estímulos.
	Ataxia	Movimentos descoordenados.
Atividades sobre o Sistema Nervoso Autônomo	Lacrimação	Observar se está presente e o grau.
	Cianose	Pele azulada.
	Ptose	Olho fechado, pálpebras caídas.
	Salivação	Observar se está presente e o grau
	Piloereção	Pêlos erguidos.

Desde a 24^a hora e até 14 dias após administração da dose, devem ser registrados a variação de peso e o consumo hídrico e de ração. Ao final do período de observação todos os animais sobreviventes devem ser submetidos à eutanásia e autopsiados. Caso sejam observadas alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos acometidos devem ser realizados (ANVISA, 2004).

Apesar da possibilidade de se utilizar testes *in vitro*, como cultura celular, os testes de toxicidade *in vivo* em mamíferos ainda são amplamente utilizados pelos cientistas e pesquisadores, visto a importância dos dados obtidos (Berenguer Rivas *et al.*, 2013; Celestino *et al.*, 2013; Farsi *et al.*, 2013; Gomes *et al.*, 2013; Gouveia *et al.*, 2013; Guissoni *et al.*, 2013).

2.4.1.2. Toxicidade Subaguda

Esse tipo de estudo, que também é conhecido como toxicidade de doses repetidas, tem como objetivo caracterizar o perfil de toxicidade de uma substância teste através da administração desta, repetidas vezes, a um grupo de animais por um determinado período de tempo. Os dados de segurança aqui obtidos dão suporte às Fases 1, 2 e 3 da Pesquisa Clínica (ANVISA, 2013).

É possível, através dos testes de toxicidade subaguda, constatar uma variedade muito ampla de potenciais alvos de toxicidade, bem como efeitos na fisiologia animal, efeitos hematológicos, bioquímicos, anatômicos e histopatológicos, além de informações sobre a indicação do NOEL (dose de efeito não observado), NOAEL (dose de efeito adverso não observado), LOAEL (menor dose com efeito adverso observado) e LOEL (menor dose com efeito observado) (OECD, 2008b; ANVISA 2013). Por tais vantagens, é um teste muito bem aceito e reproduzido no meio científico (Cunha *et al.*, 2009; Berenguer Rivas *et al.*, 2010; Patel *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2012; Bulcão *et al.*, 2013; Farsi *et al.*, 2013).

Da mesma forma que a toxicidade aguda, a via de administração recomendada é aquela que é pretendida para consumo humano (ANVISA, 2013). A espécie de escolha deve ser selecionada com base em sua relevância para extrapolação de dados para os seres humanos, sendo o rato a espécie indicada (ANVISA, 2004; OECD, 2008b; ANVISA, 2013).

Os grupos amostrais devem ser compostos por pelo menos dez animais (cinco fêmeas e cinco machos), sendo eles adultos jovens saudáveis. Deve-se utilizar um grupo controle que receba o veículo da formulação (ANVISA, 2004; OECD, 2008b; ANVISA, 2013) e seja manuseado de forma idêntica aos sujeitos dos grupos testados (OECD, 2008b).

As doses utilizadas em estudos de toxicidade subaguda são, em geral, estabelecidas a partir de informações coletadas em estudos de toxicidade aguda. No mínimo três doses devem ser testadas, mais um grupo controle, respeitando-se a dose máxima permitida de 1000 mg/kg/dia. A dose mais elevada deve ser escolhida com o objetivo de induzir efeitos tóxicos, mas não a morte ou sofrimento grave no animal. As demais doses são estabelecidas em sequência decrescente com vista a evidenciar uma correlação entre dosagem e efeitos não adversos observáveis. Sugere-se intervalos de 2 a 4 vezes para o estabelecimento das doses (OECD, 2008b; ANVISA, 2013).

A substância teste deve ser administrada aos animais durante um período de 28 dias consecutivos em uma única dose diária. O volume de líquido administrado por dia não deve exceder 2 mL/100g de peso corporal. A variabilidade do volume de ensaio deve ser minimizada através do ajuste da concentração para garantir um volume constante para todas as doses. A dose deve ser administrada no mesmo período todos os dias, e ajustada conforme necessário para manter um nível de dosagem constante em termos de peso corporal do animal (OECD, 2008b).

Os animais devem ser submetidos a exame clínico pelo menos uma vez por dia, preferencialmente no mesmo horário todos os dias. Este deve ser realizado individualmente, fora da gaiola e os dados devem ser registrados utilizando sistema de pontuação (OECD, 2008b).

Deve ser observado o maior número possível de parâmetros, baseado no *screening* hipocrático (Malone & Robichaud, 1962).

No 29º dia de experimento, os animais são anestesiados, submetidos à eutanásia, é feita a coleta de sangue e então a laparotomia para análise macroscópica dos órgãos e retirada destes para análise histopatológica. Parâmetros hematológicos (hematócrito, concentração de hemoglobina, contagem de eritrócitos, contagem total e diferencial de

leucócitos e contagem de plaquetas) devem ser quantificados, uma vez que o sistema hematopoiético é alvo de substâncias tóxicas (ANVISA, 2004; OECD, 2008b).

Determinações bioquímicas devem ser realizadas com o intuito de investigar possíveis efeitos tóxicos nos tecidos. Recomenda-se a quantificação de sódio, potássio, glicose, colesterol total, ureia, creatinina, proteínas totais, albumina, cálcio, triglicerídeos e pelos menos duas enzimas indicativas de efeitos hepáticos (gama-glutamiltanspeptidase - GGT, alanina aminotransferase - ALT, aspartato aminotransferase - AST, fosfatase alcalina - FAL) (ANVISA, 2004; OECD, 2008b).

Todos os animais do estudo devem ser submetidos à autopsia detalhada que inclua o exame da superfície externa do corpo, orifícios e órgãos internos. Recomenda-se a análise do fígado, rins, gônadas (testículos e ovários), órgãos sexuais acessórios (epidídimos, próstata, glândulas seminais, útero e colo do útero), baço, pulmão, estômago, intestino, coração e cérebro. Os órgãos devem ser limpos de tecidos aderentes, rapidamente pesados e encaminhados a análise histopatológica. Todas as lesões aparentes, bem como os órgãos suscetíveis de constituírem órgãos-alvo, também devem ser processadas e analisadas histologicamente (ANVISA, 2004; OECD, 2008b).

Além dos ensaios de toxicidade aguda e subaguda, a OECD e normativas da ANVISA também sugerem estudos de genotoxicidade, quando houver indicação de uso contínuo ou prolongado da planta por humanos.

2.4.2. Ensaios de Genotoxicidade

No início dos anos 80, os órgãos de saúde pública e as agências ambientais, em vários países industrializados, acrescentaram a mutagenicidade à lista das propriedades tóxicas a serem avaliadas antes que medicamentos fossem introduzidos no mercado. Consolidou-se, assim, o desenvolvimento da Genética Toxicológica (Doll & Peto, 1981).

A genotoxicidade é uma especialidade que se situa entre a toxicologia e a genética, sendo chamada, também, de genética toxicológica ou toxicogenética (Pegas Henriques, Erdtmann & Silva, 2003). Ela avalia os potenciais efeitos genotóxicos de uma substância (Gardner, 1977; Queiroz *et al.*, 2013) através de testes que são

categorizados pelos indicadores biológicos, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA. A associação desses indicadores, bem caracterizados e facilmente quantificados, tem fortalecido a importância dos testes de genotoxicidade (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003).

Os estudos de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo* desenhados para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações gênicas, lesões gênicas e alterações cromossômicas (ANVISA, 2013), visto que tais eventos são considerados pré-requisitos importantes para o desenvolvimento de efeitos adversos à saúde, como o câncer (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003).

A genotoxicidade não é uma medida de carcinogenicidade, mas é frequentemente utilizada como um indicador para o câncer, uma vez que os testes medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003).

Como resultado dessas considerações, os testes de genotoxicidade são rotineiramente utilizados para uma avaliação do espectro toxicológico de compostos químicos, plantas e medicamentos.

2.4.2.1. Teste do Micronúcleo

O teste do micronúcleo é um ensaio biológico realizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). É um dos mais bem estabelecidos ensaios no campo da genotoxicidade, sendo amplamente aceito pelas agências internacionais de regulação (Hayashi *et al.*, 1990).

O objetivo deste teste é a detecção de danos induzidos pela substância teste nos cromossomos ou no aparelho mitótico de eritroblastos. Essa detecção é possível através da análise dos eritrócitos na medula óssea ou dos eritrócitos policromáticos no sangue periférico de roedores (OECD, 1997).

Durante a maturação celular, o eritroblasto presente na medula converte-se em eritrócito policromático. Neste processo, o núcleo da célula é expulso, mas qualquer micronúcleo (MCN) que tenha sido formado pode permanecer no citoplasma,

possibilitando assim a sua visualização. Um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos com MCN é indicativo de dano cromossômico induzido (OECD, 1997).

O MCN se constitui de uma pequena massa nuclear delimitada por membrana e separada do núcleo principal (Figura 8). Os MCNs são formados durante a telófase, quando o envoltório nuclear é reconstituído ao redor dos cromossomos das células filhas. São resultantes de fragmentos cromossômicos que não foram incluídos no núcleo. Representam perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003).

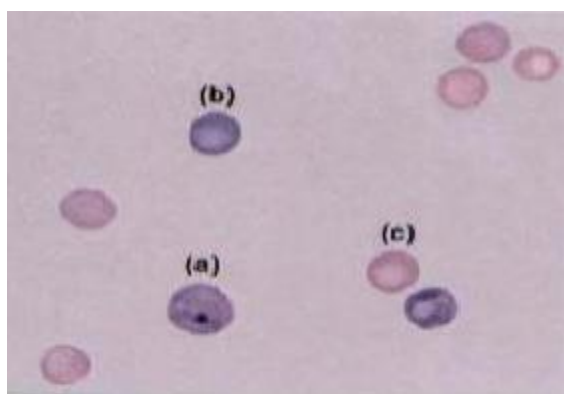


Figura 8: Eritrócito policromático com micronúcleo (a). Eritrócito policromático sem micronúcleo (b). Eritrócito normocromático (c). (Fonte: Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003).

As características básicas do teste são: (1) o efeito da substância teste é observado em eritrócitos policromáticos anucleados; (2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida curto, de modo que a presença de micronúcleos é indicativa de dano cromossômico induzido recentemente; e (3) os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida (Freitas, 2007).

O teste foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos policromáticos de medula óssea de roedores, sendo posteriormente também padronizado em sangue periférico. Diversos autores relatam o uso tanto em um como em outro sítio de ação, de forma satisfatória (Hayashi *et al.*, 1990; Maistro *et al.*, 2005; Marsiglia *et al.*, 2011; Dilek *et al.*, 2013; Doherty *et al.*, 2013; Queiroz *et al.*, 2013).

Recomenda-se o uso de ratos ou camundongos, embora qualquer espécie de mamífero possa ser a de escolha. Os grupos devem ser compostos por um mínimo de cinco animais de cada sexo (OECD, 1997). Grupos controle positivo e negativo, de

ambos os sexos, devem ser incluídos no estudo e manuseados de maneira idêntica aos animais tratados (OECD, 1997).

Os animais devem ser expostos à substância teste através de uma via apropriada, recomenda-se gavagem quando esta via for a pretendida para consumo humano. Amostras de sangue periférico são colhidas pelo menos duas vezes, a primeira amostra não antes de 36 horas após o tratamento e a segunda não após 72 horas após o tratamento. Os esfregaços devem então ser confeccionados e as lâminas coradas (OECD, 1997).

A pesquisa de MCN é realizada em eritrócitos policromáticos (ou imaturos). Para cada lâmina, deve ser analisado um mínimo de 2000 células. Além de avaliar a frequência de células imaturas micronucleadas, a percentagem de eritrócitos policromáticos no total de eritrócitos também pode ser determinada, utilizando esse dado como mais um parâmetro de toxicidade (OECD, 1997; ANVISA, 2010).

A significância estatística não deve ser o único fator determinante para considerar uma resposta positiva. Métodos estatísticos devem ser utilizados para auxiliar na avaliação dos resultados, mas sempre considerando primeiramente a importância biológica dos dados obtidos (OECD, 1997).

2.4.2.2. Ensaio Cometa – *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

O Ensaio Cometa, também conhecido como corrida de células únicas em gel de eletroforese (SCGE) trata-se de um método sensível e confiável para detectar lesões nas fitas de DNA. Essa técnica foi introduzida em 1988 por Singh e col. e desde então vem sendo adaptada por diversos autores (Rojas, Lopez & Valverde, 1999).

O teste cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são ainda passíveis de correção, possibilitando o uso do teste para, também, estudos de reparo do DNA (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003).

Diversos pesquisadores tem aplicado a versão alcalina ($\text{pH} \geq 13,0$) do SCGE na área da genética toxicológica, avaliando *in vivo* a genotoxicidade de diversos compostos (Rocha *et al.*, 2011; Alencar *et al.*, 2013; Dias *et al.*, 2013; Dilek *et al.*, 2013; Rojas *et*

al., 2013; Weber *et al.*, 2013; Fedato & Maistro, 2014). Esta técnica pode ser aplicada praticamente em qualquer órgão ou tecido, em diversos tipos de organismos alvo, necessitando apenas uma pequena quantidade de células individualizadas para a análise (Rojas, Lopez & Valverde, 1999).

O comportamento do DNA leva em consideração sua organização dentro do núcleo. Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas e suas proteínas nucleares extraídas, o DNA ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula. Esse espaço denomina-se nucleóide. Caso existam quebras (lesões) na molécula de DNA, os fragmentos clivados podem ser observados após a aplicação de uma corrente elétrica (Cook & Brazel, 1976).

Os fragmentos que são transportados para fora da nucleóide, pela eletroforese, resultam em uma imagem que remete a um cometa, com cabeça e cauda, originando assim o termo ensaio cometa (Figura 9) (Klaude *et al.*, 1996).

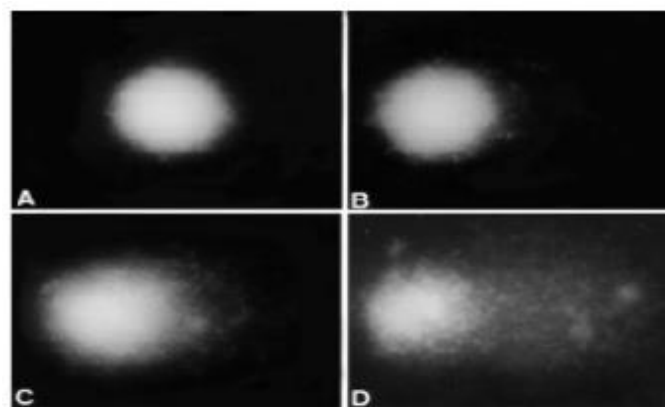


Figura 9: Classificação dos cometas em células de sangue periférico no ensaio SCGE. Classe 0 (A); Classe 1 (B); Classe 2 (C) e Classe 3 (D) (Fonte: Freitas, 2007).

Não existe célula sem dano ao DNA, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no DNA/célula. Desse modo, o teste do cometa é essencialmente comparativo, sendo imperativa a presença simultânea de controle positivo e negativo (Ribeiro, Salvadori & Marques, 2003).

3. OBJETIVOS

Geral

- Avaliar o perfil toxicológico e genotóxico do óleo obtido da polpa da *A. aculeata* em modelo animal.

Específicos

- Avaliar o espectro toxicológico do óleo obtido da polpa da *A. aculeata* em modelo animal após administração aguda e subaguda;
- Determinar a DL50;
- Avaliar os parâmetros comportamentais, fisiológicos, hematológicos, bioquímicos e histopatológicos nos animais tratados com o óleo obtido da polpa da *A. aculeata*;
- Investigar o potencial mutagênico do óleo obtido da polpa da *A. aculeata* em células de mamíferos pelo Teste do Micronúcleo;
- Investigar o potencial citotóxico do óleo obtido da polpa da *A. aculeata* em células de mamíferos pelo Teste do Micronúcleo;
- Investigar o potencial genotóxico do óleo obtido da polpa da *A. aculeata* em células de mamíferos através do Ensaio Cometa.

4. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALENCAR, M. V. O. B.; SILVA, M. B. S.; PAZ, M. F. C. J.; MORAES, G. P.; NUNES, A. T.; CAVALCANTE, A. A. C. M. Genotoxicity and nephrotoxicity of *Morinda citrifolia* in preclinical studies: public health risks. *R Interd*, v. 6, n. 1, p. 1-8, 2013.

ALMEIDA, S. P. Cerrado: aproveitamento alimentar. *Embrapa-CPAC*, Planaltina, p. 188, 1998.

AMARAL, F. P.; BROETTO, F.; BATISTELLA, C. B.; JORGE, S. M. A. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de Macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu – SP. *Rev Energ Agri*, v. 26, n. 1, p. 12-20, 2011.

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária. Portaria nº 6. Brasília, 31 de janeiro de 1995.

ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. Resolução - RE nº 90. Brasília, 16 de março de 2004.

ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Esclarecimento sobre o “Parágrafo 26” do Protocolo OECD 474 - Teste de Micronúcleo em Eritrócitos de Mamíferos. Brasília, 16 de agosto de 2010.

ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013.

AOQUI, M. *Caracterização do Óleo da Polpa de Macaúba (Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart.) e Azeite de Oliva (Olea europaea L.) Virgem Extra e Seus Efeitos Sobre Dislipidemia e Outros Parâmetros Sanguíneos, Tecido Hepático e Mutagênese Em Ratos Wistar*. Dissertação (Mestrado) – Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2012.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. P.; DAVID, J. M. Estresse Oxidativo: Relação Entre Espécies Reativas de Oxigênio e a Defesa do Organismo. *Quim Nova*, v. 29, p. 113-123, 2006.

BERENGUER RIVAS, C. A.; CASTILLO, A. A.; LORES, O. F.; ODIO, A. D.; HERNANDEZ, J. E. D.; GRIÑAN, D. L.; MARTÍNEZ, H. S.; ZAPATA, E. P.; DÍAZ, N. W. Toxicidad a dosis repetidas de *Azadirachta indica* A. Juss. (árbol del Nim). *Rev Cubana Plant Med*, v. 15, n. 3, p. 143-151, 2010.

BERENGUER RIVAS, C. A.; CASTILLO, A. A.; MARTÍNEZ, H. S.; ZAPATA, E. P.; HERNÁNDEZ, J. B.; TASSÉ, Y. M. Toxicidad aguda oral de *Azadirachta indica* (árbol del Nim). *Rev Cubana Plant Med*, v. 18, n. 3, p. 502-507, 2013.

BERGOUIGNAN, A.; MOMKENA, I.; SCHOELLER, A. D.; SIMON, C.; BLANC, S. Metabolic fate of saturated and monounsaturated dietary fats: The Mediterranean diet revisited from epidemiological evidence to cellular mechanisms. *Prog Lipid Res*, v. 48, p. 128-147, 2009.

BREVOORT, P. The U.S. botanical market: an overview. *Herbal Gram*, v. 36, p. 49-59, 1995.

BULCÃO, R. P.; FREITAS, F. A.; VENTURINI, C. G.; DALLEGRAVE, E.; DURGANTE, J.; GÖETHEL, G.; CERSKI, C. T.; ZIELINSKY, P.; POHLMANN, A. R.; GUTERRES, S. S.; GARCIA, S. C. Acute and subchronic toxicity evaluation of poly (ϵ -caprolactone) lipid-core nanocapsules in rats. *Toxicol Sci*, v. 132, n. 1, p. 162-176, 2013.

CALDEIRA, S. D.; HIANE, P. A.; RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* SW.) e do tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do Estado de Mato Grosso do Sul. *Bol Cen Pesq Pro Alim*, v. 22, n. 1, p. 145-154, 2004.

CALIXTO, J. B. Biodiversidade como fonte de medicamentos. *Cienc Cult*, v. 55, n. 3, 2003.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*, v. 33, n. 2, p. 179-189, 2000.

CARVALHO, F. M. *Influência da temperatura do ar de secagem e da utilização do ácido etilenodiaminotetracético na qualidade do óleo e caracterização do fruto de macaúba*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2010.

CELESTINO, V. R. L.; MARANHÃO, H. M. L.; VASCONCELOS, C. F. B.; LIMA, C. R.; MEDEIROS, G. C. R.; ARAÚJO, A. V.; WANDERLEY, A. G. Acute toxicity and laxative activity of *Aloe ferox* resin. *Rev bras farmacogn*, v. 23, n. 2, p. 279-283, 2013.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. *Food Res Int*, v. 44, p. 2139-2142, 2011.

COOK, P. R.; BRAZEL, I. A. Conformational constraints in nuclear DNA. *J Cell Sci*, v. 22, p. 287-302, 1976.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; JUNIOR, R. S. L. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. *Rev bras farmacogn*, v. 19, n. 2, p. 403-411, 2009.

DIAS, S. A.; NEVES, A. E. O.; FERRAZ, A. B. F.; PICADA, J. N.; PEREIRA, P. Neuropharmacological and genotoxic evaluation of ethanol extract from *Erythrina falcata* leaves, a plant used in Brazilian folk medicine. *Rev bras farmacogn*, v. 23, p. 2, p. 335-341, 2013.

DILEK, B.; AYCA, A.; MEHMET ALI, S.; ELA, K.; EBRU, D. E.; NEFISE OZLEN, S.; SAHAN, S.. In vivo genotoxicity assessment of sertraline by using alkaline comet assay and the cytokinesis-block micronucleus assay. *Basic Cl pharmacol & toxicol*, v. 113, n. 5, p. 339-346, 2013.

DOHERTY, A. T.; HAYES, J. E.; MOLLOY, J.; WOOD, C.; DONOVAN, M. R. Bone marrow micronucleus frequencies in the rat after oral administration of cyclophosphamide, hexamethyl phosphoramide or gemifloxacin for 2 and 28 days. *Toxicol Res*, v. 2, p. 321-327, 2013.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of câncer: quantitative estimates of avoidable risks of câncer in the United States today. *J Natl Cancer Inst*, v. 66, p. 1191-1308, 1981.

FARIA, L. A. *Hidrólise do óleo da amêndoa da macaúba com lipase extracelular de Colletotrichumgloesporioides produzida por fermentação em substrato líquido*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais, 2010.

FARSI, E.; SHAFAEI, A.; HOR, S. Y.; AHAMED, M. B.; YAM, M. F.; ASMAWI, M. Z.; ISMAIL, Z. Genotoxicity and acute and subchronic toxicity studies of a standardized methanolic extract of *Ficus deltoidea* leaves. *Clinics*, v. 68, n. 6, p. 865-875, 2013.

FEDATO, R. P.; MAISTRO, E. L. Absence of genotoxic effects of the coumarin derivative 4-methylesculetin in vivo and its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. *J Appl Toxicol*, v. 34, n. 1, p. 33-39, 2014.

FREITAS, P. S. *Investigação do Potencial Mutagênico do extrato de frutos de Vacciniumcorymbosum (Mirtilo) em células do sangue periférico de camundongos Swiss in vivo*. Dissertação (Mestrado) - Universidade José do Rosário Vellano - Alfenas, Minas Gerais, 2007.

GAMA, J. J. T.; SYLOS, C. M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. *Food Chem*, v. 100, p. 1686-1690, 2007.

GARDNER, E. J. *Principles of Genetics*. 5^a ed. New York: John Wilay & Sons, Inc., 1977.

GOMES, M. R. F.; SCHUH, R. S.; JACQUES, A. L. B.; DORNELES, G. G.; MONTANHA, J.; ROEHE, P. M.; BORDIGNON, S.; DALLEGRAVE, E.; LEAL, M. B.; LIMBERGER, R. P. Biological assessment (antiviral and antioxidant) and acute toxicity of essential oils from *Drimys angustifolia* and *D. brasiliensis*. *Rev bras farmacogn*, v. 23, n. 2, p. 284-290, 2013.

GOUVEIA, N. M.; ALBUQUERQUE, C. L.; ESPINDOLA, L. S.; ESPINDOLA, F. S. *Pouteria ramiflora* extract inhibits salivary amylolytic activity and decreases glycemic level in mice. *An Acad Bras Cienc*, v. 85, n. 3, p. 1141-1148, 2013.

GUISSONI, A. C. P.; SILVA, I. G.; GERIS, R.; CUNHA, L. C.; SILVA, H. H. G. Atividade larvicida de *Anacardium occidentale* como alternativa ao controle de *Aedes aegypti* e sua toxicidade em *Rattus norvegicus*. *Rev Bras Plantas Med*, v. 15, n. 3, p. 363-367, 2013.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, J. R. M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat Res*, v. 245, p. 245-249, 1990.

HENDERSON, A.; GALEANO, G.; BERNAL, R. *Field Guide to the Palms of the Americas*. 3ª ed. New Jersey: Princeton University, 1995.

HIANE, P. A.; FILHO, M. M. R.; RAMOS, M. I. L.; MACEDO, M. L. R. Bocaiúva, *Acrocomia Aculeta* (Jacq.) Lodd., Pulp and Kernel Oils: Characterization and Fatty Acid Composition. *Braz J Food Tech*, v. 8, n. 3, p. 256-259, 2005.

HIANE, P. A.; PENTEADO, M. V. C. Carotenoides de valores de vitamina A do fruto e da farinha de bocaiúva (*Acrocomia mokayayba* Barb. Rodr.) do Estado do Mato Grosso do Sul. *Rev Far Bioq Un S P*, v. 25, n. 2, p. 158-168, 1989.

HIANE, P. A.; PENTEADO, M. V. C.; BADOLATO, E. Teores de ácidos graxos e composição centesimal do fruto e da farinha da bocaiúva (*Acrocomia makayáyba* Barb. Rodr.). *Alim Nutr*, v. 2, p. 21-26, 1990.

IBAMA - Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis. 2008. Disponível em <http://www.ibama.gov.br>. Acesso em 07/02/2014.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NIGREN, J.; AHNSTROM, G. The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mut Res*, v. 363, n. 2, p. 89-96, 1996.

KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. Conservation of the Brazilian cerrado. *Conserv Biol*, v. 19, p. 707-713, 2005.

LIMA, L. R.; CAVALCANTE, R. R. L.; MARTINS, M. C. C.; PARENTE, D. M.; CAVALCANTE, A. A. M. C. Avaliação da atividade antiedematogênica, antimicrobiana e mutagênica das sementes de *Amburana cearensis* (A. C. Smith) (Imburana-de-cheiro). *Rev Bras Pl Med*, v. 15, n. 3, p. 415-422, 2013.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – *Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável*. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias), Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LORENZI, H. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. 1ª ed. Nova Odessa: Plantarum, 1992.

MAISTRO, E. L.; CARVALHO, J. C. T.; CASCON, V.; KAPLAN, M. A. C. Phytochemical and cytogenetic evaluation of *Copaifera duckei* oleo resin. *Genet Mol Biol*, v. 28, n. 4, p. 833-838, 2005.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A hippocraticscreen for purê or crude drug materials. *Llordya*, v. 25, n. 4, p. 320-331, 1962.

MARIANO, R. G.; MOURA, C.; COURI, S.; NOGUEIRA, R. I.; FREITAS, S. P.; Partition of free fatty acids in deacidification of macaúba pulp oil by liquid-liquid extraction using ethanol/water as solvent. *Def Dif For*, v. 312, p. 554-559, 2011.

MARSIGLIA, J. D. C.; LOSS, A. C. C.; STANGE, V. S.; BELCAVELLO, L.; LUZ, A. C.; BATITUCCI, M. C. P. Avaliação dos efeitos tóxico, citotóxico e genotóxico do extrato bruto hidroalcoólico de *Solanum cordifolium* Dunal e *Solanum torvum* Sw. *Natureza online*, v. 9, n. 1, p. 30-34, 2011.

MATTA, C. B. B.; SOUZA, E. T.; QUEIROZ, A. C.; LIRA, D. P.; ARAÚJO, M. V.; SILVA, L. H. A.; MIRANDA, G. E. C.; JUNIOR, J. X. A.; FILHO, J. M. B.; SANTOS, B. V. O.; MOREIRA, M. S. A. Antinociceptive and anti-inflammatory activity from Algae of the Genus *Caulerpa*. *Mar Drugs*, v. 9, p. 307-318, 2011.

MELO, J. G.; SANTOS, A. G.; AMORIM, E. L.; NASCIMENTO, S. C.; ALBUQUERQUE, U. P. Medicinal plants used as antitumor agents in Brazil: an ethnobotanical approach. *Ev-Based Compl Alt Med*, v. 2011, p. 14, 2011.

MOBOT - Missouri Botanical Garden - Manual de Plantas de Costa Rica, 2006. Disponível em <<http://www.mobot.org/MOBOT/research/treat/acoelorrapphe.shtml>>. Acesso em 07/02/2014.

MOTTA, P. E. F.; CURI, N.; OLIVEIRA-FILHO, A. T.; GOMES, J. B. V. Ocorrência da macaúba em Minas Gerais: relação com atributos climáticos, pedológicos e vegetacionais. *Pesq Agropec Bras*, v. 37, n. 7, p. 1023-1031, 2002.

MOURA, E. L.; MOTOIKE, S. Y.; VENTRELLA, M. C.; SÁ JÚNIOR, A. Q.; CARVALHO, M. Somaticembryogenesis in macawpalm (*Acrocomia aculeata*) from zygotic embryos. *Sci Hort*, v. 119, n. 4, p. 447-454, 2009.

NAGARAJU, A.; LOKESH, B. R. Interesterified coconut oil blends with groundnut oil or olive oil exhibit greater hypocholesterolemic effects compared with their respective physical blends in rats. *Nutr Res*, v. 27, p. 580-586, 2007.

NOVAES, R. F. *Contribuição para o estudo do coco macaúba*. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias), Escola Superior de Agricultura “Luiz de Queiroz” da Universidade de São Paulo, Piracicaba, 1952.

NUCCI, S. M. *Desenvolvimento caracterização e análise da utilidade de marcadores microsatélites em genética de população de macaúba*. Dissertação (Mestrado em Agricultura Tropical e Subtropical), Instituto Agrônomo Campinas, Campinas, 2007.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 474, in: OECD (Ed.), Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Paris, 1997.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 425, in: OECD (Ed.), Acute oral toxicity - Up-and-down-procedure (UDP), Paris, 2008a.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 407, in: OECD (Ed.), Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents, Paris, 2008b.

OLIVEIRA, A. K. M.; OLIVEIRA, N. A.; RESENDE, U. M.; MARTINS, P. F. R. B. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauna, Mato Grosso do Sul, Brazil. *Braz J Biol*, v. 71, n. 1, 2011.

OMONI, A. O.; ALUKO, R. E. The anti-carcinogenic and anti-atherogenic effects of lycopene: a review. *Trends Food Sci Technol*, v. 16, p. 344, 2005.

PATEL, S. S.; VERMA, S.; NAYAK, G.; SINGHAI, A. K.; GANESH, N. Acute and sub-acute toxicity studies of *Passiflora nepalensis* in rats. *Rev bras farmacogn*, v. 21, n. 4, p. 730-736, 2011.

PEGAS HENRIQUES, J. A.; ERDTMANN, B.; SILVA, L. *Genética toxicológica*. 1ª ed. Rio Grande do Sul: Ed. Alcance, 2003.

PHILIPPI, S. T. *Pirâmide dos Alimentos: fundamentos básicos da nutrição (Guias de nutrição e alimentação)*. 1ª ed. Barueri, SP: Manole, 2008.

PINTO, E. P. P.; AMOROZO, M. C. M.; FURLAN, A. Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil. *Act Bot Bras*, v. 20, n. 4, p. 751-762, 2006.

QUEIROZ, F. M.; MATIAS, K. W. O.; CUNHA, M. M. F.; SCHWARZ, A. Evaluation of (anti)genotoxic activities of *Phyllanthus niruri* L. in rat bone marrow. *Braz J Pharm Sci*, v. 49, n. 1, 2013.

RAJARAM, S.; BURKE, K.; CONNELL, B.; MYINT, T.; SABATE, J. A monounsaturated fatty acid-rich pecan-enriched diet favorably alters the serum lipid profile of healthy men and women. *J Nut*, v. 131, p. 2275-2279, 2001.

RAMIRO, M. M. *Efeito antilipidêmico do óleo extraído da polpa de *Acrocomia aculeata* (macaúba) em modelo experimental de hipercolesterolemia e hipertrigliceremia induzida pela dieta rica em frutose e gordura animal em ratos machos Wistar*. Dissertação (Mestrado). Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande, 2010.

RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A.; BRAGA NETO, J. A.; SIQUEIRA, E. M. de A. Qualidade nutricional da polpa da bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Cien Tec Al*, v. 28, p. 90-94, 2008.

REYES-GARCÍA, V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. *J ethn ethn*, v. 6, n. 32, 2010.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. As principais fitofisionomias do bioma Cerrado. *Cerrado: ecologia e flora*, v. 1, p. 153-212, 2008.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. *Mutagênese Ambiental*. 1ª ed. Rio Grande do Sul: ULBRA Editora, 2003.

ROCHA, C. A. M.; CAVALCANTI, B. C.; PESSOA, C. Ó; BAHIA, M. O.; BURBANO, R. M. R. Genotoxic effects of MeHg on *Collossoma macropomum*. *Uakari*, v. 7, n. 2, p. 23-28, 2011.

ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUZA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Cien Tecn Al*, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. *J Chrom Mex*, v. 722, n. 1, p. 221-254, 1999.

ROJAS, N.; ZEPEDA, M.; MALAGÓN, A.; ARÁN, F.; MARRERO-PONCE, V.; RIVERA, Y.; FORTOUL, E. In vivo genotoxicity and cytotoxicity assessment of a novel quinoxalinone with trichomonacide activity Rivera. *J Appl Tox*, v. 33, n. 12, p. 1493-1499, 2013.

SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Flowering and fruiting phenologies of the palm *Acrocomia aculeata*: patterns and consequences. *Biotropica*, v. 27, n. 2, p. 168-173, 1995.

SCARIOT, A.; LLERAS, E.; HAY, J. D. Reproductive biology of the palm *Acrocomia aculeata* in Central Brazil. *Biotropica*, v. 23, n. 1, p. 12-22, 1991.

SILVA, E. R.; DIEDRICH, D.; BOLZAN, R. C.; GIACOMELLI, S. R. Toxicological and pharmacological evaluation of *Discaria Americana* Gillies & Hook (Rhamnaceae) in mice. *Braz J Phar Sci*, v. 48, n. 2, 2012.

SILVA, M. R.; LACERDA, D. B. C. L.; SANTOS, G. G. S.; MARTINS, D. M. O. M. Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Cien Rural*, v. 38, n. 6, p. 1790-1793, 2008.

SILVA, P. *Farmacologia*. 8ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2010.

SILVA, P. V. B. S. *Caracterização química e avaliação do potencial antidiabético e citotóxico de óleo extraído de Acrocomia aculeata (macaúba)*. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, 2012.

SINGH, N. P.; McCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res*, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SIQUEIRA, E. M. A.; ARRUDA, S. F.; VARGAS, R. M.; SOUZA, E. M. β -Carotene from cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaves improves vitamin A status in rats. *Toxic Pharmacol*, v. 146, p. 235-240, 2007.

TASSARO, H. *Frutas no Brasil*. 1ª ed. São Paulo: Empresa das Artes, 1996.

TEIXEIRA, L. C. Potencialidades de oleaginosas para produção de biodiesel. *Informe Agropecuário*, v. 26, p. 18-27, 2005.

TUROLLA, M. S. R.; SOUZA, E. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. *Braz J Phar Sci*, v. 42, n. 2, 2006.

WEBER, L.; CARVALHO, L.; SÁ, N.; SILVA, V.; BARALDINI, N.; SOUZA, V.; CONCEIÇÃO, M. Genotoxic effects of the water-soluble fraction of heavy oil in the brackish/freshwater amphipod (*Gammaridea*) as assessed using the comet assay. *Ecotoxicology*, v. 1, p. 642-655, 2013.

WHO - World Health Organization. WHO Traditional Medicine Strategy 2002 - 2005. Geneva 2002.

5. ANEXOS

Anexo 1 - Este trabalho deu origem ao artigo “Avaliação da Toxicidade Aguda e Subaguda do óleo extraído da polpa da *Acrocomia aculeata* em Ratos” que, após versado para o inglês, será submetido para o periódico “*Phytotherapy Research*” (Fator de impacto 2,068, Qualis B1 na área Medicina II).

Anexo 2 - Critérios para publicação do periódico indicado.

Author Guidelines

Phytotherapy Research is a monthly, international journal for the publication of original research papers, short communications, reviews and letters on medicinal plant research. Key areas of interest are pharmacology, toxicology, and the clinical applications of herbs and natural products in medicine, from case histories to full clinical trials, including studies of herb-drug interactions and other aspects of the safety of herbal medicines. Papers concerned with the effects of common food ingredients and standardised plant extracts, including commercial products, are particularly welcome, as are mechanistic studies on isolated natural products. Short communications dealing with the pharmacology and screening of crude or uncharacterised extracts will be considered for publication only if they are clearly of interest to our international readership and are not deemed more suitable for a regional audience.

Phytotherapy Research does not publish agricultural, phytochemical, structure elucidation, quality control or botanical identification papers unless directly pertinent to the pharmacological effects or overall safety of plant based medicines currently in use.

Manuscript Submission. *Phytotherapy Research* operates an online submission and peer review system that allows authors to submit articles online and track their progress via a web interface. Please read the remainder of these instructions to authors and then click <http://mc.manuscriptcentral.com/ptr> to navigate to the *Phytotherapy Research* online submission site.

All papers must be submitted via the online system.

Authors are welcome to submit the names and contact details of up to three suggested reviewers, using the online system. Submission of a manuscript will be held to imply that it contains original unpublished work and is not being submitted for publication elsewhere at the same time.

File types. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are *.doc, *.docx and *.rtf. Figures must be provided in *.tiff or *.eps format.

Upon acceptance, authors **must** supply by e-mail to the Production Editor: permission grants, quoting the manuscript code. If the manuscript contains extracts, including illustrations, from other copyright works (including material from on-line or intranet sources) it is the author's responsibility to obtain written permission from the owners of the publishing rights to reproduce such extracts using the Wiley Permission Request Form.

Manuscript Style. The language of the journal is English. Please ensure that your manuscript has been checked by an English language expert if there is concern for grammatical or other errors. All submissions including book reviews must have a title, be double-line spaced with type no smaller than 12 point, and have a margin of 3cm all round. Tables must be on separate pages after the reference list, and not be incorporated into the main text. Figures should be uploaded as separate Image files.

- The **title page** must list the full title, short title of up to 60 characters and names and affiliations of all authors. Give the full address, including email, telephone and fax, of the author who is to check the proofs.
- Include the name(s) of any **sponsor(s)** of the research contained in the paper, along with **grant number(s)**.

- Supply an **abstract** of up to 200 words for all articles. An abstract is a concise summary of the whole paper, not just the conclusions, and is understandable without reference to the rest of the paper. It should contain no citation to other published work.
- Include up to six **keywords** that describe your paper for indexing purposes.
- Authors may suggest up to 3 potential reviewers
- A concise **introduction** is required of the background to the subject, its significance and its relationship to earlier works, with references.
- **Materials and methods** should be presented with clarity and detail. State the original and important findings in the **results**. Illustrate these with figures or tables where necessary but keep these to a minimum.
- **Results and discussion** may be combined as one section. Discuss the principal conclusions drawn from the results and their important implications.
- **Convention on biodiversity.** Authors must indicate that they have obtained authority to access plant samples (other than freely available commercial crops or herbal products) used for research and that this has been authorised by the appropriate agent of the government of the source country as required under the framework of the United Nations Convention on Biodiversity.
- **Botanical aspects.** Plant materials used must be adequately described using the Latin binomial for the plant, author of the name, plant family, source (e.g. country and region of collection, name of the collector and collection number) means of unambiguous identification (e.g. name and affiliation of expert botanist or the results of comparison with a published monograph and/or authenticated reference specimen). The reference number and place of deposition of a voucher specimen of the plant material must be given. For papers relating to crude plant extracts, the method of extraction and the yield of dried extract as a percentage weight of the starting fresh or dried plant material must also be stated. These should be submitted as short communications (see below).
- **Experimental procedures.** Bioassay data for plant extracts or isolated compounds must be accompanied by data for positive and negative controls. All animal experiments should be conducted in accordance with the UK Animals (Scientific Procedures) Act 1986 and associated guidelines, the EEC Directive of 1986 (86/609/EEC) or the NIH guide for the care and use of laboratory animals (NIH Publication No. 80-23; revised 1978). The Editors will reject papers if there is any doubt about the suitability of the animal procedures used.
- Use Chemical Abstracts nomenclature for chemical names and structures. Use proper or proprietary names with caution. Common acronyms for biomedical names are acceptable but define all others when first mentioned. Define abbreviations when first mentioned and do not use in the title or abstract. Define non-standard units.
- Keep acknowledgements brief and place them at the end of the paper.

Original Papers. These should not exceed five printed pages including a maximum of four figures and/or four tables and 30 references, (where one page comprises 800 words or the equivalent in illustrative and tabular material).

Short Communications. These must be complete, self-contained papers, and not preliminary reports. These should not exceed two printed pages including a maximum of two figures and/or two tables and 10 references. To exceed the limit may delay acceptance or publication of the paper.

Reviews and Keynote Lecture Transcripts. These will usually be written at the invitation of the Editors. Unsolicited reviews and manuscripts based on Conference Keynote Lectures will be welcome but authors wishing to submit these are requested to consult the Editor beforehand, ideally prior to commencement of writing. Reviews should include a Table of Contents and will normally be limited to 10,000 words including references and should be submitted via the online system.

Correspondence. Items submitted for the **correspondence columns**, which need have no fixed format are intended for constructive comments on published work or for putting forward new ideas and are published at the discretion of the Editors.

Pre-Submission English Language Editing Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at http://www.blackwellpublishing.com/bauthor/english_language.asp. Japanese authors can also find a list of local English improvement services at <http://www.wiley.co.jp/journals.editcontribute.html>. All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

Reference style. References should be quoted in the text as name and year, and listed at the end of the paper alphabetically. All references must be complete and accurate. *Phytotherapy Research* uses *Index Medicus Style* abbreviations for journals cited. For correct abbreviations visit <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7251/#IX-E>. If necessary, cite unpublished or personal work in the text but do not include it in the reference list. References should be listed in the following style:

Journals: Wright CW, Phillipson JD. 1990. Natural products and the development of selective antiprotozoal drugs. *Phytother Res* **4**: 127-139.

Books: Wagner H, Blatt S. 1996. *Plant Drug Analysis: A Thin Layer Chromatography Atlas* (2nd edn). Springer-Verlag: Berlin Heidelberg.

Chapters in Books: Kips RH. 1985. Environmental aspects. In *Pesticide Application: Principles and Practice*, Haskel PT (ed). Oxford University Press: Oxford; 1-34.

Illustrations. Upload each figure as a separate file in either .tiff or .eps format, with the lead author's name, the figure number and the top of the figure indicated. Compound figures e.g. 1a, b, c should be uploaded as one figure. Tints are not acceptable. Lettering must be of a reasonable size that would still be clearly legible upon reduction, and consistent within each figure and set of figures. Please supply artwork at the intended size for printing, sized to the text width of 84mm/single column, 176mm/double column. Where a key to symbols is required, please include this in the artwork itself, not in the figure legend. All illustrations must be supplied at the correct resolution:

- Black and white and colour photos - 300 dpi
- Graphs, drawings, etc. - 800 dpi preferred; 600 dpi minimum
- Combinations of photos and drawings (black and white and colour) - 500 dpi

The cost of printing **colour** illustrations in the journal will be charged to the author. If colour illustrations are supplied electronically in either TIFF or EPS format, they **may** be used in the PDF of the article at no cost to the author, even if this illustration was printed in black and white in the journal. The PDF will appear on the *Wiley Online Library* site.

OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of articles who wish to make their article open access. With OnlineOpen the author, their funding agency, or institution pays a fee to ensure that the article is made available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in PubMed Central and PMC mirror sites. In addition to publication online via Wiley Online Library, authors of OnlineOpen articles are permitted to post the final, published PDF of their article on a website, institutional repository, or other free public server, immediately on publication.

Copyright Transfer Agreement. If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author

Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

For authors signing the copyright transfer agreement. If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:

[CTA Terms and Conditions](#)

For authors choosing OnlineOpen. If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on [Wiley Author Services](#) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

Further Information. Proofs will be sent to the author for checking. This stage is to be used only to correct errors that may have been introduced during the production process. Prompt return of the corrected proofs, preferably within two days of receipt, will minimise the risk of the paper being held over to a later issue. Free access to the final PDF offprint of your article will be available via Author Services only (unless otherwise stated). Please therefore sign up for Author Services if you would like to access your article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Reprints of your article and copies of the journal may be ordered. There is no page charge to authors.

Authors Resources: Manuscript now accepted for publication?

If so, check out our suite of tools and services for [authors](#) and sign up for:

- Article Tracking
- E-mail Publication Alerts
- Personalization Tool

PEER Project

This journal is participating in the [PEER Project](#), an EU-funded initiative to examine the impact on scholarly journals of depositing accepted manuscripts in web-based repositories. If the corresponding author is based in an EU country, we will deposit the accepted manuscript into a central project repository (DRIVER). The article's availability will be subject to a post-publication embargo. This project has no effect on your rights or obligations under the terms of the copyright agreement pertaining to this journal.

Conflict of Interest. All authors must declare financial/commercial conflicts of interest. Even if there is none, this should be stated in a separate paragraph following on from the Acknowledgements section. This is a mandatory requirement for **all** articles.

Anexo 3 - Este trabalho deu origem ao artigo “Avaliação do potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico da *Acrocomia aculeata* em ratos” que, após versado para o inglês, será submetido para o periódico “*Human & Experimental Toxicology*” (Fator de impacto 1,453, Qualis B1 na área Medicina II).

Anexo 4 - Critérios para publicação do periódico indexado.

Manuscript Submission Guidelines

Human & Experimental Toxicology

1. [Peer review policy](#)
2. [Article types](#)
 - 2.1 [Summary of manuscript structure](#)
3. [How to submit your manuscript](#)
4. [Journal contributor's publishing agreement](#)
 - 4.1 [SAGE Choice](#)
5. [Declaration of conflicting interests policy](#)
6. [Other conventions](#)
 - 6.1 [Informed consent](#)
 - 6.2 [Ethics](#)
7. [Acknowledgments](#)
 - 7.1 [Funding acknowledgement](#)
8. [Permissions](#)
9. [Manuscript style](#)
 - 9.1 [File types](#)
 - 9.2 [Journal style](#)
 - 9.3 [Reference style](#)
 - 9.4 [Manuscript preparation](#)
 - 9.4.1 [Keywords and abstracts: Helping readers find your article online](#)
 - 9.4.2 [Corresponding author contact details](#)
 - 9.4.3 [Guidelines for submitting artwork, figures and other graphics](#)
 - 9.4.4 [Guidelines for submitting supplemental files](#)
 - 9.4.5 [English language editing services](#)
10. [After acceptance](#)
 - 10.1 [Proofs](#)
 - 10.2 [E-Prints and complimentary copies](#)
 - 10.3 [SAGE production](#)
 - 10.4 [OnlineFirst publication](#)
11. [Further information](#)



Human & Experimental Toxicology is a fully peer reviewed international journal that publishes original research and review articles on experimental and clinical studies of functional, biochemical and structural disorders.

Articles focus on causes, antidotes and other therapies using animal and human tissue and In vitro systems for the study of toxicology in medical and veterinary patients.

1. Peer review policy

The journal's policy is to obtain at least two independent reviews of each article. It operates a single-blind reviewing policy in which the reviewer's name is always concealed from the submitting author. Authors may suggest preferred reviewers and all referees will be encouraged to provide substantive, constructive reviews that provide suggestions for improving the work and distinguish between mandatory and non-mandatory recommendations.

Priority and time of publication are decided by the Editor, who retains the customary right to edit material accepted for publication (such as to meet the stylistic and bibliographic conventions of the journal). Any major redrafting is agreed with the author.

The Editor's decision in the acceptance of a given paper is final.

[Back to top](#)

2. Article types

The journal is keen to publish original research and review articles on experimental and clinical studies of functional, biochemical and structural disorders.

Please note that reports involving human participants or animals must adhere to the respective legal and ethical guidelines detailed in section 6.2.

2.1 Summary of manuscript structure:

Manuscripts should be typed, double-spaced, on one side of the paper only, and should be structured into sections as follows:

Title page; Summary and keywords; Introduction; Methods; Results; Discussion; Acknowledgements (details of supporting grants, permission for reproduction of copyright materials, etc.); References. Each section should begin on a new sheet. Other subsection headings within these main sections may be used but should be limited.

The main title should be explicit and specific (80 character limit) and an abbreviated (running) title (40-50 character limit) should be given.

The summary should form a synopsis of the work, at the same time underlining the contribution of the research to the understanding of toxicology; it should be less than 200 words in length.

Keywords (3-6) must be supplied otherwise the paper cannot be included in the annual index.

Review articles

The editors invite review articles on relevant and current topics in toxicology. Each review should contain a summary, an introduction to the topic, a careful review of the relevant literature, conclusions of the reviewed literature and recommendations, if applicable.

The journal will publish both minireviews (about 10 typewritten, double-spaced pages) and full-length, more thorough reviews (not to exceed 50 typewritten, double-spaced pages).

The reviews, either minireviews or full-length reviews, should provide a timely view on the topic covered. Figures, figure legends, tables and references are included within the allotted pages. These reviews should follow the reference, figure, figure legend and table system used for original articles published in *Human and Experimental Toxicology*.

If you would like to discuss your paper prior to submission contact the Editors:
kai.savolainen@ttl.fi or awallacehayes@comcast.net

[Back to top](#)

3. How to submit your manuscript

Before submitting your manuscript, please ensure you carefully read and adhere to all the guidelines and instructions to authors provided below. Manuscripts not conforming to these guidelines may be returned.

Human & Experimental Toxicology has a fully web-based system for the submission and review of manuscripts. All submissions should be made online at the *Human & Experimental Toxicology* SAGETRACK website:

<http://mc.manuscriptcentral.com/het>

Note: Online submission and review is now mandatory for all types of papers.

New User Account

Please log onto the website. If you are a new user, you will first need to create an account. Follow the instructions and enter a current and correct email address. Creating your account is a three-step process that takes a matter of minutes. When you have finished, your User ID and password will be sent to you via email. Please edit your user ID and password to something more memorable by selecting 'edit account' at the top of the screen. If you have already created an account but have forgotten your details type your email address in the 'Password Help' to receive an emailed reminder. Full instructions for uploading the manuscript are provided on the website.

New Submission

Submissions should be made by logging in and selecting the Author Centre and select the 'Click here to Submit a New Manuscript' option. Follow the instructions on each page, clicking the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen. If at any stage you have any questions or require the user guide, please use the 'Get Help Now' button at the top right of every screen. Further help is available through ScholarOne's® Manuscript Central™ customer support at +1 434 817 2040 x 167 or email the editor with your manuscript as an attachment(s) and write a note to explain why you need to submit via this route.

To upload your files, click on the 'Browse' button and locate the file on your computer. Select the designation of each file (i.e. main document, submission form, figure) in the drop down menu next to the browse button. When you have selected all the files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.

Review your submission (in both PDF and HTML formats) and then click the Submit button. You may suspend a submission at any point before clicking the Submit button and save it to submit later. After submission, you will receive a confirmation e-mail. You can also log back into your author centre at any time to check the status of your manuscript.

Please ensure that you submit editable/source files only (Microsoft Word or RTF) and that your document does not include page numbers; the SAGETRACK system will generate them for you, and then automatically convert your manuscript to PDF for peer review. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revisions, will be by email.

If you would like to discuss your paper prior to submission contact the Editors:
kai.savolainen@ttl.fi or awallacehayes@comcast.net

If you seek advice on the submission process please contact the Publishing Editor: charlotte.jardine@sagepub.co.uk

[Back to top](#)

4. Journal contributor's publishing agreement

Before publication, SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. SAGE's Journal Contributor's Publishing Agreement is a exclusive licence agreement which means that the author retains copyright in the work but grants SAGE the sole and exclusive right and licence to publish for the full legal term of copyright. Exceptions may exist where an assignment of copyright is required or preferred by a proprietor other than SAGE. In this case copyright in the work will be assigned from the author to the society. For more information please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the SAGE Journal Author Gateway.

4.1 SAGE Choice

If you wish your article to be freely available online immediately upon publication (as some funding bodies now require), you can opt for it to be included in SAGE Choice subject to payment of a publication fee. The manuscript submission and peer reviewing procedure is unchanged. On acceptance of your article, you will be asked to let SAGE know directly if you are choosing SAGE Choice. For further information, please visit [SAGE Choice](#).

[Back to top](#)

5. Declaration of conflicting interests

Within your Journal Contributor's Publishing Agreement you will be required to make a certification with respect to a declaration of conflicting interests. It is the policy of *Human & Experimental Toxicology* to require a declaration of conflicting interests from all authors enabling a statement to be carried within the paginated pages of all published articles.

Please include any declaration at the end of your manuscript after any acknowledgements and prior to the references, under a heading 'Conflict of Interest Statement'. If no declaration is made, the following will be printed under this heading in your article: 'None Declared'. Alternatively, you may wish to state that 'The Author(s) declare(s) that there is no conflict of interest'.

When making a declaration, the disclosure information must be specific and include any financial relationship that all authors of the article have with any sponsoring organization and the for-profit interests that the organisation represents, and with any for-profit product discussed or implied in the text of the article.

Any commercial or financial involvements that might represent an appearance of a conflict of interest need to be additionally disclosed in the covering letter accompanying your article to assist the Editor in evaluating whether sufficient disclosure has been made within the Conflict of Interest statement provided in the article.

For more information please visit the [SAGE Journal Author Gateway](#).

[Back to top](#)

6. Other conventions

6.1 Informed consent

Authors are required to ensure that the following guidelines are followed, as recommended by the International Committee of Medical Journal Editors ("Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals": http://www.icmje.org/urm_full.pdf).

Patients have a right to privacy that should not be infringed without informed consent. Identifying information, including patients' names, initials, or hospital numbers, should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that a patient who is identifiable be shown the manuscript to be published.

Complete anonymity is difficult to achieve, however, and informed consent should be obtained if there is any doubt. For example, masking the eye region in photographs of patients is inadequate protection of anonymity. If identifying characteristics are altered to protect anonymity, such as in genetic pedigrees, authors should provide assurance that alterations do not distort scientific meaning and editors should so note.

When informed consent has been obtained, it should be indicated in the submitted article.

Authors should identify individuals who provide writing/administrative assistance, indicate the extent of assistance and disclose the funding source for this assistance. Identifying details should be omitted if they are not essential.

6.2 Ethics

When reporting experiments on human subjects, indicate whether the procedures followed were in accordance with the ethical standards of the responsible committee on human experimentation

(institutional or regional) or with the Declaration of Helsinki 1975, revised Hong Kong 1989. Do not use patients' names, initials or hospital numbers, especially in illustrative material. All papers reporting results of investigations in patients and healthy volunteers must indicate that informed consent was properly obtained and that the work was approved by the relevant Institutional Ethics Committee (IRB).

When reporting experiments on animals, indicate which guideline/law on the care and use of laboratory animals was followed. Reports of experiments involving animals must indicate that national legislation or the equivalent local standard for protecting animal welfare has been followed, including a statement that the local IAUCC or ethical committee has reviewed and approved the actions and protocols detailed in the report.

[Back to top](#)

7. Acknowledgements

Any acknowledgements should appear first at the end of your article prior to your Declaration of Conflicting Interests (if applicable), any notes and your References.

All contributors who do not meet the criteria for authorship should be listed in an 'Acknowledgements' section. Examples of those who might be acknowledged include a person who provided purely technical help, writing assistance, or a department chair who provided only general support. Authors should disclose whether they had any writing assistance and identify the entity that paid for this assistance.

7.1 Funding Acknowledgement

To comply with the [guidance for Research Funders, Authors and Publishers](#) issued by the Research Information Network (RIN), *Human & Experimental Toxicology* additionally requires all Authors to acknowledge their funding in a consistent fashion under a separate heading. All research articles should have a funding acknowledgement in the form of a sentence as follows, with the funding agency written out in full, followed by the grant number in square brackets:

This work was supported by the Medical Research Council [grant number xxx].

Multiple grant numbers should be separated by comma and space. Where the research was supported by more than one agency, the different agencies should be separated by semi-colons, with "and" before the final funder. Thus:

This work was supported by the Wellcome Trust [grant numbers xxxx, yyyy]; the Natural Environment Research Council [grant number zzzz]; and the Economic and Social Research Council [grant number aaaa].

In some cases, research is not funded by a specific project grant, but rather from the block grant and other resources available to a university, college or other research institution. Where no specific funding has been provided for the research we ask that corresponding authors use the following sentence:

This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, or not-for-profit sectors.

Please include this information under a separate heading entitled "Funding" directly after any other Acknowledgements prior to your "Declaration of Conflicting Interests" (if applicable), any Notes and your References.

For more information on the guidance for Research Funders, Authors and Publishers, please visit: <http://www.rin.ac.uk/funders-acknowledgement>.

[Back to top](#)

8. Permissions

Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the SAGE Journal Author Gateway.

[Back to top](#)

9. Manuscript style

9.1 File types

Only electronic files conforming to the journal's guidelines will be accepted. Preferred formats for the text and tables of your manuscript are Word DOC, and tiff or jpeg for figures (ideally figures will use journal colours). Please also refer to additional guideline on submitting artwork [and supplemental files] below.

9.2 Journal Style

For style information and lists of standard abbreviations, consult the American Medical Association Manual of Style: A Guide for Authors and Editors, 9th Edition (Baltimore: Williams & Wilkins, 1998). Use metric units throughout the manuscript. The use of footnotes is not permitted. Single quotation marks should be used throughout. Words to be italicised should be underlined. Whenever possible drugs should be referred to by their generic name rather than by a proprietary name. When a proprietary name must be used, it should begin with a capital letter to indicate this.

9.3 Reference Style

Human & Experimental Toxicology adheres to the SAGE Vancouver reference style. [Click here](#) to review the guidelines on SAGE Vancouver to ensure your manuscript conforms to this reference style.

References should be numbered consecutively in the order that they are first mentioned in the text, and these numbers should be inserted above the line each time the author is cited, eg '...As others have done.^{2-5,7} The full list of references at the end of the article should be arranged in numerical order. Each reference should include the names and initials of all authors, but if there are more than four the first author may be followed by et al, the title of the article, the unabbreviated title of the journal, the year, the volume, and first and last page numbers. Titles of books should be followed by the place of publication, the publisher, and the year. References to 'unpublished observations' or 'personal communications' should be mentioned in the text but not included in the list of references. The titles of periodicals should be unabbreviated. The style is as follows:

Alcock G, Brown DW. The Minnesota coding of EEGs applied to the evaluation of beta-blockers in ischaemic heart disease. *British Medical Journal* 1983; 287: 3010-3015.

Alcock G, Brown DW. The Minnesota Coding of EEGs. Macmillan Press: London, 1983

9.4. Manuscript Preparation

The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3cm for left and right hand margins and 5cm at head and foot. Text should be standard 10 or 12 point.

9.4.1 Keywords and Abstracts: Helping readers find your article online

The title, keywords and abstract are key to ensuring that readers find your article online through online search engines such as Google. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords by visiting SAGE's Journal Author Gateway Guidelines on [How to Help Readers Find Your Article Online](#).

9.4.2 Corresponding Author Contact details

Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers. Academic affiliations are required for all co-authors.

9.4.3 Guidelines for submitting artwork, figures and other graphics

For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's [Manuscript Submission Guidelines](#).

Images should be supplied as bitmap based files (i.e. with .tiff or .jpeg extension) with a resolution of at least **300 dpi** (dots per inch). Line art should be supplied as vector-based, separate .eps files (not as .tiff files, and not only inserted in the Word or pdf file), with a resolution of **600 dpi**. Images should be clear, in focus, free of pixilation and not too light or dark.

If, together with your accepted article, you submit usable colour figures, these figures will appear in colour online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in colour in the printed version. For specifically requested colour reproduction in print, you will receive information regarding the possible costs from SAGE after receipt of your accepted article.

In text: tables and figures are either inserted as part of a sentence, for example table 1 or in parentheses for example (figure 1). Each table should carry a descriptive heading. Each figure should be submitted electronically.

Illustrations

All illustrations (photographs or line drawings) should be about 1.5 times the intended final size. The proportions of the printed page should be borne in mind when authors are preparing the format of illustrations. Glossy prints of photographs are necessary. Any lettering or annotation on photographs or line drawings should be indicated on a tracing overlay or a photocopy of the original. The use of symbols should be consistent. All illustrations should be identified on the back by the name of the principal author and the figure number. If the orientation of an illustration is not obvious it should be indicated on the back. All illustrations should be numbered as figures whether they are photographs, representational drawings or graphs, i.e. Figure 1, Figure 2, Figure 3. Captions for illustrations should be collected together and presented on a separate page. All illustrations should be specifically referred to in the text. Authors will be expected to defray the extra cost of printing any illustrations in colour, estimated at \$1000 for the first page and \$500 for each additional page. Electronic submission of figures is encouraged. The preferred formats include .EPS and .TIF. Preferred programs include Photoshop, Illustrator and CorelDraw.

Tables

Tables ideally should not have more than 80, and certainly not more than 100, characters to the line (counting spaces between columns as 4 characters) unless absolutely unavoidable. Each table should be on a separate page with its caption. All tables should be specifically referred to in the text.

9.4.4 Guidelines for submitting supplemental files

The journal may be able to host approved supplemental materials online, alongside the full-text of articles. Supplemental files will be subjected to peer-review alongside the article. Please contact the Editors (kai.savolainen@ttl.fi or awallacehayes@comcast.net) in the first instance. For more information please refer to SAGE's [Guidelines for Authors on Supplemental Files](#).

9.4.5 English Language Editing services

Non-English speaking authors who would like to refine their use of language in their manuscripts might consider using a professional editing service. Visit <http://www.sagepub.co.uk/authors/journal/submission.sp> for further information.

[Back to top](#)

10. After acceptance

10.1 Proofs

We will email a PDF of the proofs to the corresponding author. Corrections should be limited to typographical amendments. Authors' approval will be assumed if corrections are not returned by the date indicated.

10.2 E-Prints and Complimentary Copies

SAGE provides authors with access to a PDF of their final article. For further information please visit <http://www.sagepub.co.uk/authors/journal/reprint.sp>.

10.3 SAGE Production

At SAGE we place an extremely strong emphasis on the highest production standards possible. We attach high importance to our quality service levels in copy-editing, typesetting, printing, and online publication (<http://online.sagepub.com/>). We also seek to uphold excellent author relations throughout the publication process.

We value your feedback to ensure that we continue to improve our author service levels. On publication all corresponding Authors will receive a brief survey questionnaire on your experience of publishing in *Human & Experimental Toxicology* with SAGE.

10.4 OnlineFirst Publication

Human & Experimental Toxicology provides the opportunity for your article to be included in OnlineFirst, a feature offered through SAGE's electronic journal platform, SAGE Journals Online. It allows final revision articles (completed articles in queue for assignment to an upcoming issue) to be hosted online prior to their inclusion in a final print and online journal issue. This significantly reduces the lead time between submission and publication. For more information please visit our [OnlineFirst Fact Sheet](#).

[Back to top](#)

11. Further information

Jennie Atkinson
Publishing Editor
Medicine and Life Science Journals
SAGE Publications Ltd
1 Oliver's Yard, 55 City Road
London, EC1Y 1SP, UK
Email: jennie.atkinson@sagepub.co.uk

Anexo 5 – Parecer do Comitê de Ética no Uso de Animais.

MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA

Dourados-MS, 29 de outubro de 2013.

Senhora Pesquisadora:
Silvia Aparecida Oesterreich

O Projeto de sua responsabilidade – Protocolo nº. 028/2013 – CEUA/UFOD - intitulado "AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE, CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DO ÓLEO DA *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart EM RATOS ATRAVÉS DOS TESTES DE TOXICIDADE AGUDA, TOXICIDADE SUBAGUDA, TOXICIDADE REPRODUTIVA, ENSAIO DO COMETA, TESTE DO MICRONÚCLEO E SISTEMA TESTE *Allium cepa*" foi integralmente **APROVADO** e poderá ser conduzido.

Ressaltamos que é de responsabilidade do (a) pesquisador (a) envio de notificação à CEUA sobre o término do projeto.

Prof. Dr. Fernando Miranda de Vargas Junior

Coordenador/CEUA

Anexo 6 – Dados não mostrados nos artigos.**Tabela 1.** Peso absoluto (g) e relativo (g/100g) dos órgãos das ratas tratadas com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) após exposição aguda e respectivo controle.

Parâmetros		Grupos Experimentais	
		Controle	OPAC 2000 mg/kg
Fígado	(g)	10,25 ± 0,28	10,43 ± 0,43
	(g/100g)	4,61 ± 0,26	4,58 ± 0,39
Rim (direito)	(g)	1,00 ± 0,05	0,92 ± 0,04
	(g/100g)	0,45 ± 0,03	0,40 ± 0,02
Baço	(g)	0,46 ± 0,03	0,48 ± 0,05
	(g/100g)	0,20 ± 0,02	0,21 ± 0,01
Coração	(g)	0,86 ± 0,04	0,87 ± 0,09
	(g/100g)	0,38 ± 0,02	0,38 ± 0,02
Pulmões	(g)	1,28 ± 0,07	1,29 ± 0,16
	(g/100g)	0,57 ± 0,06	0,57 ± 0,11
Útero	(g)	0,45 ± 0,04	0,50 ± 0,08
	(g/100g)	0,20 ± 0,01	0,22 ± 0,04
Ovário (direito)	(g)	0,07 ± 0,01	0,06 ± 0,01
	(g/100g)	0,03 ± 0,005	0,02 ± 0,008

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Os animais (n=5/grupo) foram observados por 14 dias. $p > 0,05$ (ANOVA/Teste “t” de Student).

Tabela 2. Peso absoluto (g) e relativo (g/100g) dos órgãos dos ratos fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.

Parâmetros		Grupo Controle	OPAC 125mg/kg	OPAC 250mg/kg	OPAC 500mg/kg	Satélite
Fígado (g)	F	9,38 ± 0,78	8,10 ± 0,54**	8,00 ± 0,53**	8,49 ± 0,35**	8,79 ± 0,73**
	M	13,02 ± 0,83	11,65 ± 1,38*	11,55 ± 0,98*	13,04 ± 1,62	10,75 ± 0,41*
Fígado (g/100g)	F	3,88 ± 0,12	3,69 ± 0,17	3,64 ± 0,22	3,90 ± 0,14	3,63 ± 0,19
	M	3,91 ± 0,10	3,73 ± 0,15	3,66 ± 0,25	3,88 ± 0,28	3,69 ± 0,17
Rim (g)	F	0,94 ± 0,07	0,82 ± 0,05*	0,87 ± 0,05*	0,81 ± 0,03*	0,85 ± 0,08*
	M	1,35 ± 0,11	1,29 ± 0,15	1,25 ± 0,10	1,32 ± 0,08	1,16 ± 0,13
Rim (g/100g)	F	0,39 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,39 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,37 ± 0,01
	M	0,40 ± 0,01	0,41 ± 0,02	0,39 ± 0,01	0,39 ± 0,02	0,38 ± 0,03
Baço (g)	F	0,45 ± 0,04	0,37 ± 0,02*	0,38 ± 0,04*	0,39 ± 0,02*	0,37 ± 0,04*
	M	0,56 ± 0,07	0,51 ± 0,07	0,48 ± 0,05	0,50 ± 0,04	0,45 ± 0,04
Baço (g/100g)	F	0,18 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,17 ± 0,01	0,18 ± 0,01	0,16 ± 0,01
	M	0,16 ± 0,02	0,16 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01	0,15 ± 0,01
Coração (g)	F	0,83 ± 0,06	0,82 ± 0,05	0,81 ± 0,04	0,82 ± 0,03	0,85 ± 0,05
	M	1,15 ± 0,12	0,96 ± 0,08**	1,16 ± 0,07	1,14 ± 0,07	1,08 ± 0,06
Coração (g/100g)	F	0,34 ± 0,01	0,37 ± 0,01	0,37 ± 0,02	0,37 ± 0,01	0,38 ± 0,02
	M	0,34 ± 0,01	0,31 ± 0,03	0,37 ± 0,01	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,02
Pulmão (g)	F	1,25 ± 0,07	1,23 ± 0,04	1,26 ± 0,04	1,23 ± 0,09	1,22 ± 0,04

	M	1,47 ± 0,07	1,45 ± 0,14	1,54 ± 0,08	1,46 ± 0,07	1,48 ± 0,07
Pulmão (g/100g)	F	0,52 ± 0,02	0,56 ± 0,01	0,50 ± 0,03	0,56 ± 0,04	0,54 ± 0,03
	M	0,44 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,46 ± 0,01	0,43 ± 0,01	0,46 ± 0,02

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Os animais (n=10/grupo) foram gavados e observados por 28 dias consecutivos.

*p < 0,05 comparado ao controle; **p < 0,01 comparado ao controle (ANOVA/Teste Dunnett).

Tabela 3. Peso absoluto (g) e relativo (g/100g) dos órgãos reprodutivos das ratas fêmeas (útero e ovário direito) e ratos machos (testículo direito, epidídimo direito, ducto deferente direito e próstata) tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.

Parâmetros	Grupo Controle	OPAC 125mg/kg	OPAC 250mg/kg	OPAC 500mg/kg	Satélite
	Fêmeas				
Útero (g)	0,46 ± 0,11	0,40 ± 0,14	0,65 ± 0,25	0,43 ± 0,21	0,51 ± 0,25
Útero (g/100g)	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,06	0,30 ± 0,12	0,19 ± 0,09	0,22 ± 0,10
Ovário (g)	0,06 ± 0,01	0,05 ± 0,00	0,05 ± 0,01	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,01
Ovário (g/100g)	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,02 ± 0,00
Machos					
Testículo (g)	1,31 ± 0,04	1,40 ± 0,05	1,41 ± 0,06	1,47 ± 0,11	1,37 ± 0,07
Testículo (g/100g)	0,39 ± 0,04	0,45 ± 0,04	0,45 ± 0,03	0,44 ± 0,04	0,46 ± 0,03
Epidídimo (g)	0,52 ± 0,03	0,50 ± 0,06	0,52 ± 0,03	0,53 ± 0,02	0,51 ± 0,01
Epidídimo (g/100g)	0,15 ± 0,01	0,16 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,17 ± 0,00
Ducto (g/100g)	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,02	0,10 ± 0,00	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,01
Ducto (g/100g)	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,03 ± 0,00
Próstata (g)	0,65 ± 0,08	0,61 ± 0,14	0,57 ± 0,08	0,64 ± 0,17	0,54 ± 0,10
Próstata (g/100g)	0,19 ± 0,02	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,03	0,19 ± 0,04	0,18 ± 0,01

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Os animais (n=10/grupo) foram gavados e observados por 28 dias consecutivos. p > 0,05 (ANOVA/Teste Dunnett).

Tabela 4. Parâmetros bioquímicos no soro dos ratos fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.

Parâmetros		Grupo Controle	OPAC 125mg/kg	OPAC 250mg/kg	OPAC 500mg/kg	Satélite
AST (U/L)	F	75,6 ± 2,50	68,8 ± 6,90	74,4 ± 14,97	72,6 ± 13,10	80 ± 6,01
	M	81,4 ± 7,89	72 ± 11,64	73,8 ± 7,31	75,8 ± 7,79	75 ± 4,47
ALT (U/L)	F	39,8 ± 5,93	38 ± 2,91	40,2 ± 6,30	45 ± 6,96	37,6 ± 2,07
	M	46,8 ± 2,28	40 ± 6,04	39,6 ± 5,31	43,2 ± 3,11	43,4 ± 3,36
Bilirrubina Direta (mg/dL)	F	0,03 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,00
	M	0,04 ± 0,00	0,04 ± 0,00	0,03 ± 0,02	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01
Bilirrubina Total (mg/dL)	F	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,09 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,11 ± 0,01
	M	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,11 ± 0,02	0,09 ± 0,01	0,12 ± 0,01
Proteínas Totais (g/dL)	F	6,14 ± 0,35	6,00 ± 0,29	6,16 ± 0,32	6,06 ± 0,16	6,01 ± 0,30
	M	5,84 ± 0,08	5,78 ± 0,26	5,28 ± 0,25**	5,70 ± 0,33	6,16 ± 0,75
Albumina (g/dL)	F	4,38 ± 0,08	4,36 ± 0,20	4,48 ± 0,04*	4,40 ± 0,1	4,36 ± 0,20
	M	4,14 ± 0,08	4,04 ± 0,21	3,68 ± 0,20*	4 ± 0,20	4,36 ± 0,20
Globulina (g/dL)	F	1,72 ± 0,27	1,64 ± 0,28	1,74 ± 0,29	1,64 ± 0,19	1,64 ± 0,26
	M	1,68 ± 0,08	1,74 ± 0,25	1,60 ± 0,12	1,72 ± 0,21	1,74 ± 0,29
Relação albumina/globulina	F	2,62 ± 0,40	2,7 ± 0,49	2,64 ± 0,37	2,7 ± 0,30	2,7 ± 0,40
	M	2,42 ± 0,16	2,42 ± 0,43	2,30 ± 0,21	2,38 ± 0,29	2,64 ± 0,85
Ureia (mg/dL)	F	56,98 ± 7,53	54,24 ± 5,69	57,92 ± 6,59	51,14 ± 0,90	50,98 ± 1,90

	M	43,9 ± 7,90	45 ± 4,40	44,2 ± 4,93	43,9 ± 5,79	46,76 ± 5,29
Creatinina (mg/dL)	F	0,23 ± 0,05	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,05	0,20 ± 0,01	0,24 ± 0,05
	M	0,2 ± 0,02	0,2 ± 0,1	0,3 ± 0	0,25 ± 0,07	0,22 ± 0,04
Sódio (mmol/dL)	F	142,44 ± 1,13	141,06 ± 2,34	140,22 ± 0,80	141,42 ± 51,14	139,96 ± 3,9
	M	142,5 ± 0,99	142,8 ± 1,14	139,68 ± 1,33	138,32 ± 5,01	141,58 ± 2,74
Potássio (mmol/L)	F	5,32 ± 0,22	5,22 ± 0,88	5,60 ± 0,53	4,96 ± 0,71	5,07 ± 0,57
	M	5,08 ± 0,32	5,20 ± 0,67	5,03 ± 0,43	4,56 ± 0,19	4,73 ± 0,23
Cálcio (mg/dL)	F	10,78 ± 0,87	10,94 ± 0,93	11,1 ± 0,54	10,36 ± 0,31	9,72 ± 0,33*
	M	10,54 ± 0,20	10,30 ± 0,14	9,92 ± 0,23**	10,00 ± 0,35**	10,10 ± 0,15**
Colesterol Total (mg/dL)	F	68,98 ± 7,56	71,66 ± 8,61	69,18 ± 7,79	78,84 ± 6,95*	66,71 ± 8,12
	M	77,2 ± 9,72	70 ± 7,80	69,48 ± 5,10	72,75 ± 14,11	70,96 ± 5,73

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Os animais (n=10/grupo) foram gavados e observados por 28 dias consecutivos.

*p < 0,05 comparado ao controle; **p < 0,01 comparado ao controle (ANOVA/Teste Dunnett).

Tabela 5. Parâmetros hematológicos dos ratos fêmeas (F) e machos (M) tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) após exposição subaguda e respectivo controle.

Parâmetros		Grupo Controle	OPAC 125mg/kg	OPAC 250mg/kg	OPAC 500mg/kg	Satélite
Leucócitos ($10^3/\mu\text{L}$)	F	3,45 ± 1,80	3,07 ± 1,39	3,49 ± 1,68	3,92 ± 1,64	3,82 ± 1,65
	M	4,43 ± 2,02	4,44 ± 1,35	3,98 ± 2,22	4,82 ± 0,36	4,55 ± 1,48
Eritrócitos ($10^6/\mu\text{L}$)	F	7,84 ± 0,18	7,99 ± 0,36	8,05 ± 0,27	7,88 ± 0,22	7,96 ± 0,38
	M	8,92 ± 0,32	8,75 ± 0,11	8,38 ± 0,23*	8,72 ± 0,13	8,76 ± 0,27
Hemoglobina (g/dL)	F	13,68 ± 0,37	13,62 ± 0,97	14,22 ± 0,64	13,86 ± 0,42	13,44 ± 0,47
	M	15,1 ± 0,56	14,64 ± 0,18	14,3 ± 0,45	14,9 ± 0,38	15,15 ± 0,64
Hematócrito (%)	F	44,58 ± 1,59	44,3 ± 2,80	44,24 ± 2,00	42,62 ± 1,81	41,98 ± 1,17
	M	47,24 ± 1,87	45,56 ± 0,43	43,54 ± 1,57**	44,96 ± 1,58	44,98 ± 1,66
Plaquetas ($10^3/\mu\text{L}$)	F	625,8 ± 95,04	547,2 ± 78,26	439,6 ± 124,84	586 ± 146,40	517,4 ± 89,54
	M	611,8 ± 137,77	647,2 ± 55,16	556,6 ± 83,61**	594,8 ± 58,97	612,8 ± 71,07
RDW (%)	F	13,44 ± 0,43	13,86 ± 0,73	13,8 ± 1,28	12,86 ± 0,49	13,22 ± 1,86
	M	14,24 ± 0,91	13,74 ± 1,07	13,54 ± 0,29	14,18 ± 1,07	14,8 ± 1,07
Neutrófilos (%)	F	19,64 ± 3,40	19,06 ± 4,98	17,8 ± 3,84	20,56 ± 6,18	20,24 ± 6,67
	M	17,52 ± 3,86	21,98 ± 12,37	23,56 ± 5,37	24,12 ± 3,80	14,76 ± 2,38
Linfócitos (%)	F	72,86 ± 9,59	75,85 ± 6,36	77,48 ± 5,68	74,14 ± 8,30	73,58 ± 7,32
	M	79,32 ± 3,66	74,98 ± 13,06	71,46 ± 8,31	72,66 ± 3,97	82,36 ± 2,28
Monócitos (%)	F	5,4 ± 6,36	2,98 ± 1,01	3,08 ± 2,76	3,42 ± 3,00	3,92 ± 3,25

	M	2,14 ± 0,46	2,06 ± 1,94	3,56 ± 2,92	1,98 ± 0,61	1,52 ± 0,37
Eosinófilos (%)	F	1,44 ± 0,30	1,82 ± 0,98	1,4 ± 0,25	1,58 ± 0,42	2,04 ± 0,81
	M	0,84 ± 0,33	0,82 ± 0,16	1,22 ± 0,51	1,2 ± 0,58	1,16 ± 0,16
Basófilos (%)	F	0,66 ± 0,66	0,32 ± 0,30	0,24 ± 0,20	0,3 ± 0,2	0,22 ± 0,17
	M	0,18 ± 0,10	0,16 ± 0,14	0,2 ± 0,1	0,04 ± 0,08	0,2 ± 0,2

Valores expressos em média ± erro padrão da média. Os animais (n=10/grupo) foram gavados e observados por 28 dias consecutivos. RDW: largura de distribuição dos eritrócitos. *p < 0,05 comparado ao controle; **p < 0,01 comparado ao controle (ANOVA/Teste Dunnett).

Figura 10. Histopatologia do fígado de ratos tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) e respectivo controle (H&E x 100). (A) Grupo Controle Negativo sem alterações. Visualização de veias centro lobulares à esquerda e espaço porta à direita. (B) Grupo OPAC 1000 mg/kg também sem alterações.

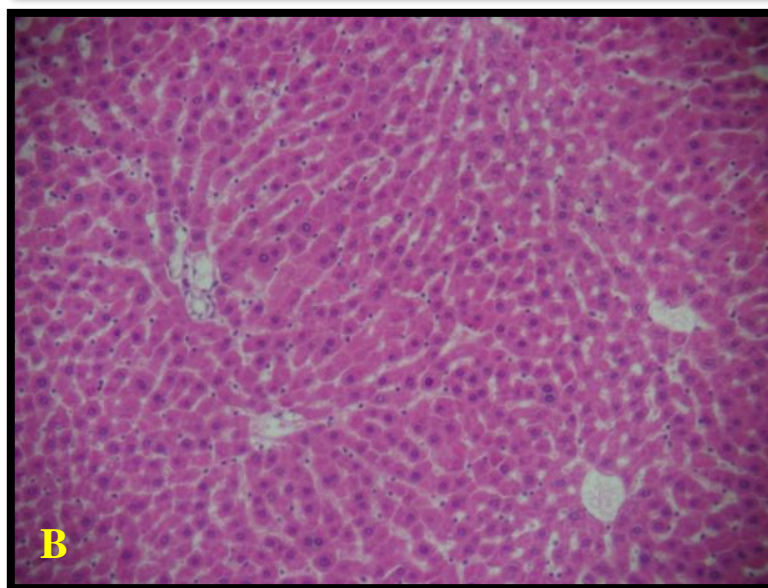
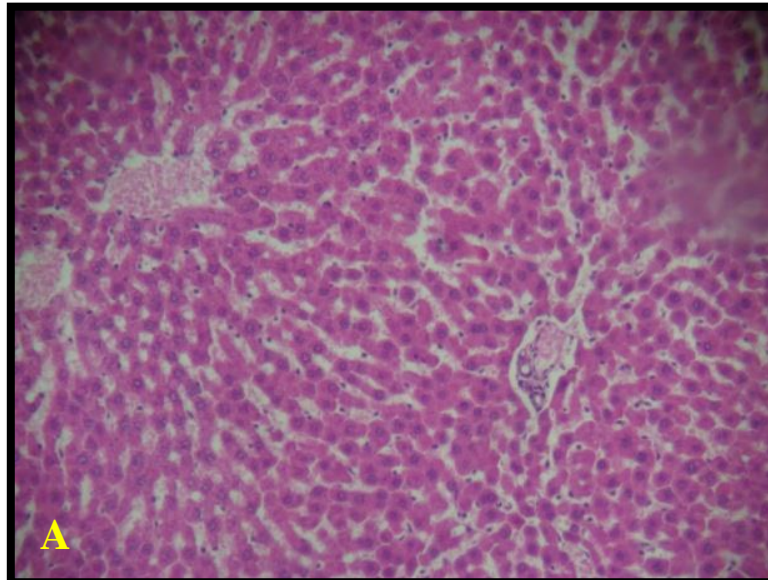


Figura 11. Histopatologia do rim de ratos tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) e respectivo controle (H&E x 100). (A) Grupo Controle Negativo sem alterações. Visualização de túbulos e glomérulos. (B) Grupo OPAC 1000 mg/kg também sem alterações.

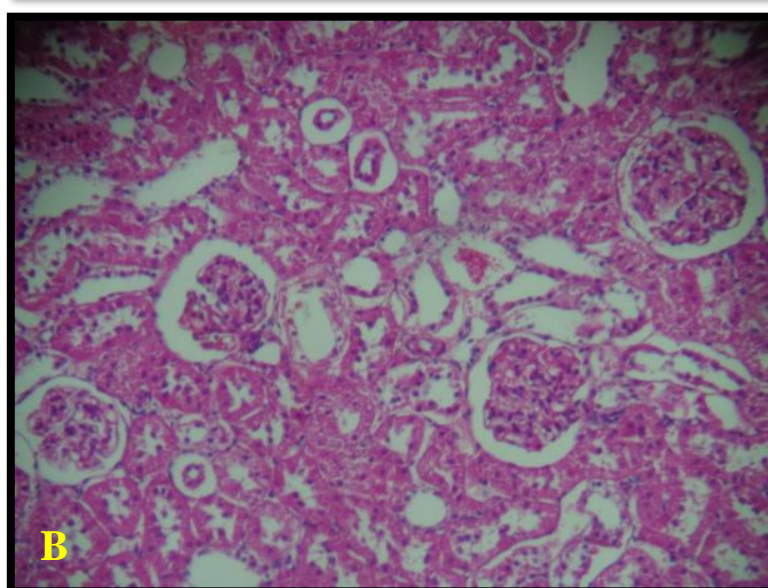
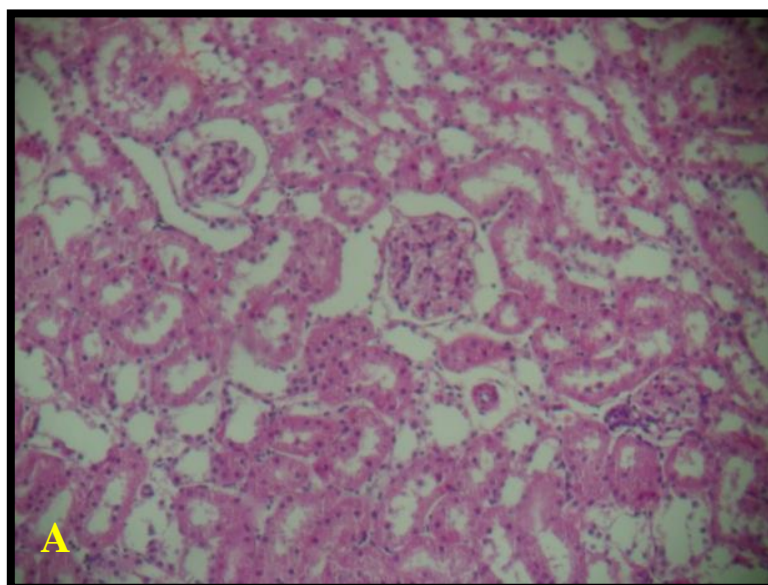


Figura 12. Histopatologia do pulmão de ratos tratados com o óleo extraído da polpa da *A. aculeata* (OPAC) e respectivo controle (H&E x 100). (A) Grupo Controle Negativo sem alterações. Visualização de um bronquíolo e uma pequena artéria. (B) Grupo OPAC 1000 mg/kg com visualização de um foco de infiltrado inflamatório perivascular, lesão espontânea não significativa.

