

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**Toxicidade pré-clínica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess):
avaliação dos efeitos agudos, subcrônicos, genotóxicos e teratogênicos em
ratos Wistar**

GISELI KARENINA TRAESEL

**Dourados - MS
2017**

GISELI KARENINA TRAESEL

Toxicidade pré-clínica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess):
avaliação dos efeitos agudos, subcrônicos, genotóxicos e teratogênicos em ratos
Wistar

Área do CNPq: Ciências da Saúde: 04.00.00.00-1

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD), para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Farmacologia

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Aparecida Oesterreich

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Candida Aparecida Leite Kassuya

Dourados - MS
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).

T764t Traesel, Giseli Karenina

Toxicidade pré-clínica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess):: avaliação dos efeitos agudos, subcrônicos, genotóxicos e teratogênicos em ratos Wistar / Giseli Karenina Traesel -- Dourados: UFGD, 2017.

106f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Silvia Aparecida Oesterreich

Co-orientadora: Candida Aparecida Leite Kassuya

Tese (Doutorado em Ciências da Saúde) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados.

Inclui bibliografia

1. Toxicologia alimentar. 2. Alimento funcional. 3. DL50. 4. Segurança. 5. Teratologia. I. Título.

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

©Direitos reservados. Permitido a reprodução parcial desde que citada a fonte.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DA GRANDE DOURADOS
FACULDADE DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO APRESENTADA PELA CANDIDATA GISELI KARENINA TRAESEL, ALUNA DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "FARMACOLOGIA".

Ao décimo sexto dia do mês de outubro do ano de dois mil e dezessete (16/10/2017), às 13h30min, em sessão pública, realizou-se, no Auditório da Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal Grande Dourados, a Defesa de Tese de Doutorado intitulada "**Toxicidade pré-clínica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess): avaliação dos efeitos agudos, subcrônicos, genotóxicos e teratogênicos em ratos Wistar.**" apresentada pela doutoranda GISELI KARENINA TRAESEL, do Programa de Pós-Graduação Doutorado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dra. Silvia Aparecida Oesterreich** (Presidente/orientadora), **Dr. Luiz Augusto Freire Lopes** (membro titular/externo), **Dra. Virgínia Demarchi Kappel Trichez** (membro titular/programa), **Dra. Karine de Cássia Freitas Gielow** (membro titular/externo), e **Dr. Nelson Carvalho Farias Junior** (membro titular/externo). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Tese. Após a candidata ter apresentado a sua Tese, no tempo previsto de 30 até 40 minutos, os componentes da Banca Examinadora fizeram suas arguições, que foram intercaladas pela defesa do candidato, no tempo previsto de até 240 minutos. Terminadas as arguições, a Banca Examinadora, em sessão secreta, passou ao julgamento, tendo sido a candidata considerada **APROVADA**, fazendo *jus* ao título de **DOUTORA EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 16 de outubro de 2017.

Dra. Silvia Aparecida Oesterreich _____

Dr. Luiz Augusto Freire Lopes _____

Dra. Virgínia Demarchi Kappel Trichez _____

Dra. Karine de Cássia Freitas Gielow _____

Dra. Nelson Carvalho Farias Junior _____

ATA HOMOLOGADA EM: ___/___/___, PELA PRÓ-REITORIA DE ENSINO DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA / UFGD.

Profa. Kely de Picoli Souza
Pró-Reitora de Ensino de Pós-Graduação e Pesquisa

“O uso de animais em pesquisa é um privilégio. Estes animais que estão nos ajudando a desvendar os mistérios da Ciência merecem nosso respeito e o melhor cuidado possível. Um animal bem tratado irá proporcionar resultados científicos mais confiáveis, o que deve ser o objetivo de todos os pesquisadores”.

(Marco Aurélio Guimarães)

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO DA LITERATURA

Figura 1. Aspecto visual do fruto do *Caryocar brasiliense* e seus componentes. (A) 19
Pericarpo ou casca. (B) Mesocarpo externo ou polpa branca. (C) Mesocarpo interno
ou polpa comestível. (D) Endocarpo ou envoltório da amêndoa. (E) Amêndoa.
Fonte: adaptado de SILVA (2011).

ARTIGO II

Figure 1. Histopathological analysis of organs of rats treated with oil extract of *C.* 79
brasiliense pulp in the subchronic toxicity (H&E: 20X and 40X). (A and B) liver;
(C and D) kidney; (E and F) lung; (G and H) testis; (I and J) brain.

ARTIGO III

Figure 1. Composition of carotenoids (lycopene and β -carotene) in the *Caryocar* 86
brasiliense pulp oil (OPCB).

Figure 2. Effects of treatment with *Caryocar brasiliense* pulp oil (OPCB) and 86
 $K_2Cr_2O_7$ (positive control) on the *Artemia salina* assay. Results are presented as
mean \pm S.E.M., n=10, in quadruplicate. One-way ANOVA followed by the Tukey
test was used ($p < 0.05$). Different letters indicate statistical significant differences.
Cell viability activity: percentage of surviving nauplii.

Figure 3. Effects of treatment with *Caryocar brasiliense* pulp oil (OPCB) and 87
cyclophosphamide (positive control) on the DNA damage frequency using the
peripheral blood of female and male Wistar rats. Results are presented as mean \pm
S.E.M., n=5 animals/group. One-way ANOVA followed by the Tukey test was used
($p < 0.05$). Different letters indicate statistically significant differences. Damage
frequency: number of cells with damage in 100 cells analyzed.

Figure 4. Effects of treatment with *Caryocar brasiliense* pulp oil (OPCB) and 88
cyclophosphamide (positive control) on the counts of micronucleated polychromatic
erythrocytes (MN-PCEs) using the bone marrow of female and male Wistar rats.
Results are presented as mean \pm S.E.M., n=5 animals/group. One-way ANOVA
followed by the Tukey test was used ($p < 0.05$). Different letters indicate
statistically significant differences. 2000 cells were analyzed in each animal.

Figure 5. Effects of treatment with *Caryocar brasiliense* pulp oil (OPCB) and cyclophosphamide (positive control) on the polychromatic to normochromatic erythrocytes ratio (PCEs/NCEs ratio) using the bone marrow of female and male Wistar rats. Results are presented as mean \pm S.E.M., n=5 animals/group. One-way ANOVA followed by the Tukey test was used ($p < 0.05$). Different letters indicate statistically significant differences. 100 cells were analyzed in each animal. 88

ARTIGO IV

Figure 1. Evaluation of weight gain of the female rats treated orally with the oil of *Caryocar brasiliense* during the 6th until the 15th day of gestation. The data are expressed as mean \pm SEM, n= 6-7 animals/group. The values do not differ from one another at the level of 5% (ANOVA/Tukey test). 94

Figure 2. Percentage (%) of newborns classified small (SAP), adequate (AAP) and large (LAP) for age of pregnancy, from female rats treated with the oil of *Caryocar brasiliense* during the 6th until the 15th day of gestation. The values do not differ from one another at the level of 5% (Qui-Square). 97

Figure 3. Evaluation of external abnormalities of the newborns of the female rats treated orally with the oil of *Caryocar brasiliense* during the 6th until the 15th day of gestation. (A) Newborn of the group 1000 mg/kg presenting bruise. (B) Newborn of the group control presenting developmental delay (on the right). 975

Figure 4. Evaluation of skeletal abnormalities of the newborns of the female rats treated orally with the oil of *Caryocar brasiliense* during the 6th until the 15th day of gestation. (A) Newborn of the group 250 mg/kg presenting incomplete ossification of bone nasal. (B) Newborn of the group control presenting misshaped of bone supraoccipital. (C) Newborn of the group 500 mg/kg presenting absent of one rib. (D) Newborn of the group 1000 mg/kg presenting ribs supernumerary bilateral. (E) Newborn of the group control presenting ribs wavy. (F) Newborn of the group 500 mg/kg presenting two sternebra bipartite. 99

DADOS COMPLEMENTARES

Figura 1. Análise macroscópica de órgãos (rim, baço, pulmão, coração e fígado) de animais tratados com solução salina (A) e com o óleo do pequi (B). 102

Figura 2. Classificação dos cometas em leucócitos de sangue periférico de um animal controle positivo. 103

- Figura 3.** Eritrócito policromático (PCE), normocromático (NCE) e policromático micronucleado (MN-PCE) em medula óssea de um animal controle positivo. 103
- Figura 4.** Esfregaço vaginal confirmando a prenhez pela presença de espermatozoides. 105
- Figura 5.** Cornos uterinos da fêmea n2 do grupo controle negativo. É possível observar onze pontos de implante e duas reabsorções visíveis. 105
- Figura 6.** Ovário direito da fêmea n2 do grupo controle negativo. É possível observar a contagem de seis corpos lúteos. 106
- Figura 7.** Feto com alteração macroscópica (hematoma), na fêmea n8 do grupo 1000 mg/kg/dia. 106
- Figura 8.** Feto normal (esquerda) e feto com atraso de desenvolvimento (direita) e suas respectivas placentas, na fêmea n6 do grupo controle negativo. 107
- Figura 9.** Feto após processamento com vermelho de alizarina, pronto para contagem dos pontos de ossificação e análise esquelética. 107

LISTAS DE TABELAS

ARTIGO I

Tabela 1. Composição centesimal da polpa e amêndoa do <i>C. brasiliense</i> .	67
Tabela 2. Constituintes químicos identificados em diferentes partes do <i>C. brasiliense</i> .	68
Tabela 3. Composição percentual de ácidos graxos na polpa do <i>C. brasiliense</i> .	70
Tabela 4. Estudos toxicológicos em diferentes partes do <i>C. brasiliense</i> .	71

ARTIGO II

Table 1. Fatty acids composition of oil extract of <i>C. brasiliense</i> pulp (gas chromatograph equipped with autosampler and FID).	76
Table 2. Physiological habits: body weight gain and food and water consumption of rats treated orally with oil extract of <i>C. brasiliense</i> pulp.	77
Table 3. Physiological habits: body weight gain and food and water consumption of rats during the observation period satellite (consecutive 19 days after finished subchronic toxicity).	77
Table 4. Organ weights and relative organ weights (g/100 g of body weight) of rats treated orally with oil extract of <i>C. brasiliense</i> pulp.	77
Table 5. Biochemical parameters of rats treated orally with oil extract of <i>C. brasiliense</i> pulp.	78
Table 6. Hematological parameters of rats treated orally with oil extract of <i>C. brasiliense</i> pulp.	79
Table 7. Histopathological analysis of organs of rats treated with oil extract of <i>C. brasiliense</i> pulp in the subchronic toxicity.	80

ARTIGO III

Table 1. Characterization of the lycopene and β -carotene values by chromatographic analysis in <i>Caryocar brasiliense</i> pulp oil (OPCB).	85
Table 2. Effects of treatment with <i>Caryocar brasiliense</i> pulp oil (OPCB) and cyclophosphamide (positive control) on the DNA damage index using the peripheral blood of female and male Wistar rats.	87

ARTIGO IV

Table 1. Maternal findings of the female rats treated orally with the oil of <i>Caryocar brasiliense</i> during the 6 th until the 15 th day of gestation.	94
Table 2. Absolute and relative organ weight of the female rats treated orally with the oil of <i>Caryocar brasiliense</i> during the 6 th until the 15 th day of gestation.	95
Table 3. Biochemical parameters in blood of the female rats treated orally with the oil of <i>Caryocar brasiliense</i> during the 6 th until the 15 th day of gestation.	95
Table 4. Hematological parameters in blood of the female rats treated orally with the oil of <i>Caryocar brasiliense</i> during the 6 th until the 15 th day of gestation.	96
Table 5. Embryo–fetal toxicity related to reproductive findings of the female rats treated orally with the oil of <i>Caryocar brasiliense</i> during the 6 th until the 15 th day of gestation.	96
Table 6. Counting of centers of ossification of the newborns of the female rats treated orally with the oil of <i>Caryocar brasiliense</i> during the 6 th until the 15 th day of gestation.	98
Table 7. Summary of major malformations and minor skeletal variations in the newborns of the female rats treated orally with the oil of <i>Caryocar brasiliense</i> during the 6 th until the 15 th day of gestation.	98

DADOS COMPLEMENTARES

Tabela 1. Informações sobre o ciclo estral de ratas.	104
---	-----

LISTA DE SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

μL	<i>Microliter</i> (Microlitro)
AAP	<i>Adequate for age of pregnancy</i> (Adequado para a idade de prenhez)
ABTS	<i>2,2'-azino-bis (3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid)</i> (2,2'-azino-bis (3-etilbenzotiazolin) 6-ácido sulfônico)
ALT	<i>Alanine aminotransferase</i> (Alanina aminotransferase)
ANOVA	<i>Analysis of variance</i> (Análise de variância)
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	<i>Aspartate aminotransferase</i> (Aspartato aminotransferase)
bw	<i>Body weight</i> (Peso corporal)
CAT	Catalase
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CNS	<i>Central nervous system</i> (Sistema nervoso central)
DAD	<i>Diode array detector</i> (Detector de arranjo de diodos)
DL ₅₀	Dose letal média
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
DPPH	<i>2,2-diphenyl-1-picrylhydrazyl</i> (2,2-difenil-1-picrilhidrazilo)
EPA	<i>Environmental Protection Agency</i> (Agência de Proteção Ambiental)
FDA	<i>Food and Drugs Administration</i> (Administração de Alimentos e Drogas)
FID	<i>Flame ionization detector</i> (Detector de ionização de Chama)
FSH	<i>Follicle-stimulating hormone</i> (Hormônio folículo-estimulante)
g	<i>Gram</i> (Gramas)
GPx	Glutationa peroxidase
GR	Glutationa redutase
H&E	<i>Hematoxylin-eosin</i> (Hematoxilina-eosina)
HDL	<i>High density lipoprotein</i> (Lipoproteína de alta densidade)
HPLC	<i>High-performance liquid chromatography</i> (Cromatografia líquida de alta eficiência)
ICMBio	Instituto Chico Mendes de Conservação da Biodiversidade
kg	<i>Kilogram</i> (Quilograma)
LAP	<i>Large for age of pregnancy</i> (Grande para a idade de prenhez)
LD ₅₀	<i>Median lethal dose</i> (Dose letal média)

LDL	<i>Low density lipoprotein</i> (Lipoproteína de baixa densidade)
LH	<i>Luteinizing hormone</i> (Hormônio luteinizante)
LOAEL	<i>Low observed adverse effect level</i> (Menor dose com efeito adverso observado)
LOEL	<i>Low observed effect level</i> (Menor dose com efeito observado)
MCH	<i>Mean corpuscular hemoglobin</i> (Hemoglobina corpuscular média)
MCHC	<i>Mean corpuscular hemoglobin concentration</i> (Concentração de hemoglobina corpuscular média)
MCV	<i>Mean corpuscular volume</i> (Volume corpuscular médio)
mg	<i>Milligram</i> (Miligrama)
mL	<i>Mililiter</i> (Mililitro)
MMA	Ministério do Meio Ambiente
MN-PCEs	<i>Micronucleated polychromatic erythrocytes</i> (Eritrócitos policromáticos micronucleados)
NOAEL	<i>No observed adverse effect level</i> (Dose de efeito adverso não observado)
NOEL	<i>No observed effect level</i> (Dose de efeito não observado)
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i> (Organização para a Cooperação de Desenvolvimento Econômico)
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPCB	<i>Oil from the pulp of Caryocar brasiliense</i> (Óleo da polpa do <i>Caryocar brasiliense</i>).
ORAC	<i>Oxygen radical absorbance capacity</i> (Capacidade de absorção do radical oxigênio)
PCEs/NCE ratio	<i>Polychromatic to normochromatic erythrocytes ratio</i> (Razão entre eritrócitos policromáticos e normocromáticos)
RDW	<i>Red cell distribution width</i> (Amplitude de distribuição dos eritrócitos)
SAP	<i>Small for age of pregnancy</i> (Pequeno para a idade de prenhez)
SEM	<i>Standard error of the mean</i> (Erro padrão da média)
SINITOX	Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas
SISBIO	Sistema de Autorização e Informação em Biodiversidade
SMART	<i>Somatic Mutation and Recombination Test</i> (Teste de Mutação e Recombinação Somática)
SOD	Superóxido dismutase

Toxicidade pré-clínica do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess): avaliação dos efeitos agudos, subcrônicos, genotóxicos e teratogênicos em ratos Wistar

RESUMO

O *Caryocar brasiliense* Cambess (pequi) é um fruto brasileiro de importante distribuição geográfica e de ampla utilização popular para fins nutricionais e medicinais. Apesar da literatura demonstrar sua eficácia para diversas atividades biológicas, até o momento os estudos toxicológicos são incipientes e não sustentam a segurança do seu uso. Neste contexto, o presente estudo teve como objetivo avaliar a toxicidade pré-clínica do óleo extraído da polpa do *C. brasiliense* (OPCB) em ratos Wistar. O óleo foi extraído por prensagem a frio (prensa tipo expeller) e analisado por cromatografia (líquida e gasosa). Inicialmente, o ensaio *Artemia salina* foi conduzido para determinar a taxa de letalidade de diferentes doses do OPCB. Subsequentemente, para o teste de toxicidade aguda, ratos Wistar fêmeas receberam, via oral, dose única de 2000 mg/kg do OPCB, seguida de observação dos animais por 14 dias. Para os testes de toxicidade subcrônica, ensaio cometa e teste do micronúcleo, ratos Wistar machos e fêmeas receberam, por via oral, doses repetidas de 125, 250, 500 ou 1000 mg/kg/dia do OPCB, sendo tratados e observados por 28 dias. Para o teste de toxicidade do desenvolvimento, ratos Wistar fêmeas, prenhas, receberam, via oral, doses repetidas de 250, 500 ou 1000 mg/kg/dia do OPCB durante o período da organogênese (d6 ao d15 de prenhez). A análise química indicou elevada presença de ácido oleico, β -caroteno e licopeno. No teste de *Artemia salina*, todas as doses do OPCB mantiveram taxas de viabilidade estatisticamente semelhantes ao controle negativo. No teste de toxicidade aguda não foram observadas alterações nem mortalidade, indicando que a DL_{50} é superior a 2000 mg/kg. No teste de toxicidade subcrônica, as doses testadas não produziram alterações significativas nos parâmetros comportamentais, fisiológicos, bioquímicos ou histopatológicos dos animais tratados. Algumas diferenças estatísticas foram encontradas no hemograma dos animais experimentais em relação ao controle negativo. Porém, os resultados estão dentro dos valores de referência estipulados para a espécie e, portanto, não foi atribuída significância clínica a essa variação. No ensaio cometa, os animais tratados com OPCB mantiveram seus índices e frequências de dano estatisticamente similares ao controle negativo e diferentes do controle positivo, demonstrando que o óleo não foi capaz de causar dano genético aos animais tratados. O teste do micronúcleo, realizado na medula óssea dos animais, apontou a ausência de efeitos clastogênicos, aneugênicos ou citotóxicos do óleo. Para o teste de toxicidade do desenvolvimento, o tratamento com o OPCB não interferiu negativamente nos parâmetros reprodutivos maternos e contagem dos pontos de ossificação dos fetos, bem como não causou toxicidade materna, embriotoxicidade ou teratogenicidade na prole. Em conjunto, esses resultados indicam que, em nossas condições experimentais, o óleo da polpa do pequi não causou toxicidade aguda, subcrônica, genética ou sobre o desenvolvimento de ratos Wistar. Esses dados fornecem estimativas de segurança para uso humano, inclusive durante a gravidez, e fornecem informações de dosagem de referência para novas investigações sobre o perfil de segurança desta planta.

Palavras-chave: toxicologia alimentar, alimento funcional, DL_{50} , segurança, teratologia, prenhez.

Preclinical toxicity of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Cambess): evaluation of acute, subchronic, genotoxic and teratogenic effects in Wistar rats

ABSTRACT

Caryocar brasiliense Cambess (pequi) is a Brazilian fruit of important geographic distribution and widely used for nutritional and medicinal purposes. Although literature demonstrates its efficacy in various biological activities, the toxicological studies are at an incipient stage and so far do not support the safety of its use. In this context, the present study aimed to evaluate the preclinical toxicity of the oil extracted from *C. brasiliense* pulp (OPCB) in Wistar rats. The oil was extracted by cold pressing (expeller type of press) and analyzed by chromatography (liquid and gas). Initially, the *Artemia salina* assay was conducted to determine the lethality rate of different doses of the OPCB. Subsequently, for the acute toxicity test, female Wistar rats received a single oral dose of 2000 mg/kg OPCB, followed by animal observation for 14 days. For the subchronic toxicity test, comet assay and micronucleus test, male and female Wistar rats received orally repeated doses of 125, 250, 500 or 1000 mg/kg/day of the OPCB, being treated and observed for 28 days. For the developmental toxicity test, pregnant female Wistar rats received oral doses of 250, 500 or 1000 mg/kg/day of the OPCB during the period of organogenesis (d6 to d15 of pregnancy). The chemical analysis indicated a high presence of oleic acid, β -carotene and lycopene. In the *Artemia salina* test, all doses of the OPCB maintained viability rates statistically similar to the negative control. In the acute toxicity test, no changes or mortality were observed, indicating that the LD₅₀ is greater than 2000 mg/kg. In the subchronic toxicity test, the doses tested did not produce significant changes in the behavioral, physiological, biochemical or histopathological parameters of OPCB-treated animals. Some statistical differences were found in the hemogram of experimental animals in relation to the negative control. However, the results are within the stipulated reference values for the species and, therefore, no clinical significance was attributed to this variation. In the comet assay, animals treated with the OPCB maintained their indexes and frequencies of damage statistically similar to the negative control and different from the positive control, demonstrating that the oil was not able to cause genetic damage in treated animals. The micronucleus test, which was performed in the bone marrow of animals, indicated the absence of clastogenic, aneugenic or cytotoxic effects of the oil. For the developmental toxicity test, the OPCB treatment did not adversely interfere the maternal reproductive parameters, the count of fetal ossification sites nor did it cause maternal toxicity, embryotoxicity or teratogenicity in the offspring. Taken together, these results indicate that, under our experimental conditions, pequi pulp oil did not cause acute, subchronic, genetics or developmental toxicity in Wistar rats. These data provide safety estimates for human use, even during pregnancy, and dosing information for further investigations regarding the safety profile of this plant.

Key words: food toxicology, functional food, LD₅₀, safety, teratology, pregnancy.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	18
2.1. Espécies vegetais.....	18
2.1.1. <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.....	19
2.2. Ensaio pré-clínicos de toxicidade de produtos naturais.....	19
2.2.1. Toxicidade Aguda.....	21
2.2.1.1. Desenho Experimental de Toxicidade Aguda.....	21
2.2.2. Toxicidade Subcrônica.....	23
2.2.2.1. Desenho Experimental de Toxicidade Subcrônica.....	23
2.2.3. Genotoxicidade.....	24
2.2.3.1. Lesão Gênica.....	25
2.2.3.1.1. Desenho Experimental de Lesão Gênica.....	25
2.2.3.2. Mutação Gênica.....	26
2.2.3.2.1. Desenho Experimental de Mutação Gênica.....	27
2.2.4. Toxicologia do Desenvolvimento.....	28
2.2.4.1. Desenvolvimento Embriofetal.....	30
2.2.4.2. Plantas Medicinais e Toxicidade Reprodutiva.....	33
2.2.4.3. Desenho Experimental de Toxicologia do Desenvolvimento.....	36
3. OBJETIVOS.....	38
4. CONCLUSÕES.....	39
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40
6. APÊNDICES.....	46
6.1. Artigo I: Aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos do pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Cambess.).....	46
6.2. Artigo II: Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> , Camb.) pulp in rats.....	73
6.3. Artigo III: Safety assessment of the oil from pequi (<i>Caryocar brasiliense</i> Camb.): evaluation of the potential genotoxic and clastogenic effects.....	82
6.4. Artigo IV: Evaluation of embryotoxic and teratogenic effects of the oil	

extracted from <i>Caryocar brasiliense</i> Cambess pulp in rats.....	91
7. ANEXOS.....	101
7.1. Parecer de aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais.....	101
7.2. Dados Complementares.....	102

1. INTRODUÇÃO

O uso de produtos de origem vegetal, seja como alimento funcional ou como planta medicinal, continua a expandir-se rapidamente em todo o mundo. Durante a última década, em particular, foi possível observar um aumento significativo na aceitação popular de terapias naturais. Este recente ressurgimento do interesse popular em plantas medicinais foi atribuído a diversos fatores, entre os quais se destacam: eficácia dos medicamentos vegetais, preferência dos consumidores em terapias naturais, crença errônea da ausência de reações adversas dos produtos naturais, insatisfação com os efeitos colaterais dos medicamentos alopáticos e alto custo das drogas modernas (EKOR, 2014).

O *Caryocar brasiliense* Cambess, popularmente conhecido como pequi ou piqui, é uma planta distribuída, cultivada e consumida no centro-oeste brasileiro (LIMA et al., 2007). Análises químicas do fruto do *C. brasiliense* apontaram elevados níveis de compostos antioxidantes, tais como carotenoides e fenólicos totais (GODOY; RODRIGUEZ-AMAYA, 1994; MONTEIRO et al., 2015; PLACIDO et al., 2015) e ácidos graxos insaturados, principalmente o ácido oleico (LIMA et al., 2007).

Os frutos do *C. brasiliense* desempenham importante papel econômico, sendo muito utilizados para produção de óleo vegetal, na indústria de cosméticos e principalmente na cozinha tradicional, devido ao seu característico sabor (ALMEIDA; SILVA, 1994). O óleo extraído do fruto é popularmente empregado para o tratamento de doenças respiratórias, como gripe e asma (KHOURI et al., 2007), bem como para tratar lesões gástricas (ALVES, 2014). Em relação aos efeitos farmacológicos estudados do óleo, há relatos de efeitos anti-inflamatórios, hipocolesterolêmicos (MIRANDA-VILELA et al., 2009), antifúngicos (PASSOS et al., 2002), antígenotóxicos (MIRANDA-VILELA et al., 2008) e efeitos quimiopreventivos em lesões pré-neoplásicas em modelos animais (COLOMBO et al., 2015; PALMEIRA et al., 2016).

Enquanto o consumo global de extratos vegetais aumenta, também surgem preocupações em relação à segurança do uso destes produtos. Muitas plantas que são consumidas pela população, embora tenham potencial biológico promissor, não foram avaliadas quanto seus possíveis efeitos adversos e tóxicos (RAYNOR et al., 2011).

Os testes de avaliação da toxicidade pré-clínica compreendem uma parte inicial de estabelecimento de DL₅₀ (dose letal média) e de detecção de efeitos sistêmicos. A partir de então, segue-se para testes mais específicos, como toxicologia genética e toxicologia do desenvolvimento. Os estudos utilizados para essas avaliações são baseados nas normas da

Environmental Protection Agency (EPA) e recomendados pela *Food and Drugs Administration* (FDA), pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) e, no Brasil, pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA, 2013).

Considerando a necessidade de conhecimento sobre a toxicidade de plantas medicinais, considerando o potencial nutracêutico descrito para o fruto do *C. brasiliense* e, ainda, considerando a falta de estudos que determinem a ação tóxica desta espécie, esta tese objetivou avaliar os efeitos do óleo extraído da polpa do *C. brasiliense*, empregando os modelos internacionalmente recomendados para avaliação de toxicidade pré-clínica em ratos Wistar. Os estudos recomendados pelo FDA, OECD e ANVISA foram empregados para avaliar: I. Toxicidade aguda, II. Toxicidade Subcrônica, III. Genotoxicidade e IV. Teratogênese.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Espécies vegetais

Há milhares de anos, o homem vem utilizando os recursos da natureza para o tratamento de diversas doenças. 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; NASCIMENTO, 2006). Dessa forma, o uso de plantas com finalidades medicinais foi estabelecendo-se na cultura popular e intensificando-se com o passar do tempo (EKOR, 2014).

Na área farmacêutica, as espécies vegetais foram e continuam sendo de grande relevância, tendo em vista a utilização das substâncias ativas oriundas destas espécies como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas farmacêuticas. Estima-se que somente 37% das drogas produzidas entre 1982 e 2007 foram obtidas exclusivamente de síntese química com *screening* farmacológico randomizado. Os outros 63% das moléculas produzidas neste período tiveram sua origem em produtos naturais, enquadrando-se como produto natural propriamente dito, sendo derivadas destes ou ainda mimetizando a ação de um produto natural (NEWMAN; CRAGG, 2007).

O Brasil é considerado o país com maior diversidade vegetal do planeta. Dentre as espécies vegetais brasileiras, inúmeras possuem propriedades farmacológicas relevantes, importantes não só como alternativa terapêutica, mas também como fonte econômica para o país. Existem aproximadamente 55.000 espécies de plantas superiores catalogadas no país, estando distribuídas em diversas regiões fitogeográficas, a saber: Floresta Atlântica, Floresta Amazônica, Pampas, Caatinga, Pantanal e Cerrado (ENGELKE, 2003).

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 e percorre 14 estados brasileiros, sendo a região centro-oeste a de maior predominância (WALTER; RIBEIRO, 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. Estima-se que mais de 220 espécies nativas do Cerrado são utilizadas com fins medicinais (OLIVEIRA et al., 2011).

Já em relação à potencialidade alimentícia, ressalta-se a importância do bioma no fornecimento de espécies frutíferas com alto valor nutricional (ROCHA et al., 2013). Os

frutos oriundos do Cerrado apresentam propriedades funcionais importantes que são atribuídas à presença de diversas substâncias bioativas. Entre as espécies frutíferas presentes no Cerrado brasileiro destacam-se o buriti, o araticum, o baru, a cagaita, a guavira, a macaúba e, ainda, o objeto do nosso estudo: o pequi.

2.1.1. *Caryocar brasiliense* Cambess

A revisão de literatura referente ao pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess) (Figura 1) encontra-se na forma de artigo, disponível no Apêndice I (páginas 44 – 70) desta tese.



Figura 1. Aspecto visual do fruto do *Caryocar brasiliense* e seus componentes. (A) Pericarpo ou casca. (B) Mesocarpo externo ou polpa branca. (C) Mesocarpo interno ou polpa comestível. (D) Endocarpo ou envoltório da amêndoa. (E) Amêndoa. Fonte: adaptado de SILVA (2011).

2.2. Ensaios pré-clínicos de toxicidade de produtos naturais

Muitas espécies com propriedades funcionais e/ou medicinais são utilizadas pela população com base apenas em conhecimentos empíricos. Entretanto, somente a sabedoria popular é insuficiente para comprovar a segurança de uso de uma planta medicinal. A Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde, através da Política Nacional de Plantas Medicinas e Fitoterápicos (BRASIL, 2006), determina a toxicologia como uma das etapas mestras para o desenvolvimento de fitoterápicos. Dessa forma, os ensaios toxicológicos são necessários para avaliar os níveis de toxicidade e efeitos adversos associados ao consumo de qualquer substância (SILVA et al., 2012).

Toxicidade pode ser definida como a propriedade potencial de uma determinada substância de instalar um estado patológico em consequência de sua introdução ou interação com o organismo alvo (OGA et al., 2008).

A toxicidade, dentro do contexto de produtos naturais, tornou-se hoje um problema de saúde pública. Numerosos e irrefutáveis casos de envenenamento vêm sendo relatados na literatura envolvendo o uso de plantas (EKOR, 2013). Mais de 5000 suspeitas de reações adversas relacionadas ao uso de ervas foram informadas a Organização Mundial da Saúde antes de 1996. Entre 1993 e 1998, 2621 eventos adversos associados ao uso de suplementos dietéticos foram informados ao FDA. Pesquisa realizada no Reino Unido sugere uma incidência de evento adverso atribuído ao uso de fitoterápicos em torno de 7% (SILVEIRA et al., 2008).

No Brasil, dados do Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas (SINITOX) apontam que, somente no ano de 2014, foram registrados 761 casos de intoxicação humana por plantas no país. Entre as causas descritas destacam-se: uso terapêutico, automedicação, ingestão alimentar e tentativa de suicídio/homicídio/aborto (SINITOX, 2017). Entretanto, esse número tende a ser superior, pois muitos casos não são registrados ou são notificados como exposição à agente tóxico desconhecido. O fato da notificação de eventos toxicológicos não ser obrigatória no Brasil também favorece a subnotificação (CAMPOS et al., 2016).

A alta incidência de eventos adversos associados ao uso de plantas medicinais decorre, principalmente, da crença de que o que é natural é isento de reações tóxicas. Sabe-se, porém, que muitas plantas apresentam constituintes que tem potencial para desencadear reações adversas, que podem estar relacionadas a efeitos tóxicos hepáticos, renais, cardíacos, reprodutivos, sanguíneos, dérmicos, comportamentais ou até mesmo sobre o DNA (TCHAMADEU et al., 2011).

Diversas plantas consumidas no Brasil apresentam propriedades tóxicas, dependendo do preparo e uso. A babosa (*Aloe vera* L.), por exemplo, apresenta efeitos nefrotóxicos, o confrei (*Symphytum officinale* L.) e a valeriana (*Valeriana officinales* L.) estão associados com danos hepáticos agudos, a arruda (*Ruta graveolens* L.) está relacionada com casos de aborto e efeitos teratogênicos. O alho (*Allium sativum* L.) e o gengibre (*Zingiber officinale* Roscoe) são reportados como antiplaquetários (SILVEIRA et al., 2008; BOCHNER et al., 2012).

No Brasil, a legislação para medicamentos fitoterápicos vem sofrendo modificações nos últimos anos. A ANVISA 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 (ANVISA, 1995). A portaria nº 18 de 2004 dispôs sobre os registros de medicamentos fitoterápicos (ANVISA, 2004). Em 2006 foi publicado o decreto que aprova a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (BRASIL, 2006). Já em 2013, foi publicado um guia que normatiza diversos testes pré-clínicos a serem realizados para o desenvolvimento de medicamentos (ANVISA, 2013).

As normativas da ANVISA são instituídas tendo como base as recomendações internacionais de agências de harmonização e vigilância de medicamentos. Os estudos pré-clínicos de toxicidade são baseados nas normas da *Environmental Protection Agency* e recomendados pela *Food and Drugs Administration* e pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (ANVISA, 2013).

Os testes de toxicidade em geral são utilizados para avaliar ou para prever os efeitos tóxicos nos sistemas biológicos ou para averiguar a toxicidade relativa das substâncias. A avaliação pré-clínica permite caracterizar os efeitos tóxicos relacionados a órgãos-alvo, dose dependência, tempo seguro para exposição, reversibilidade de efeitos e determinar o tempo em que sinais de toxicidade aparecem e desaparecem (OECD, 2008a,b).

2.2.1. Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda é um ensaio realizado em roedores que tem como objetivo avaliar a toxicidade produzida por uma substância quando esta é administrada a animais em uma ou mais doses por um período inferior a 24 horas, seguido da observação dos animais por 14 dias (ANVISA, 2013).

Este teste é importante por ser utilizado como um rastreio inicial de toxicidade, permitindo determinar a dose letal média (DL_{50}) de qualquer substância (OECD, 2008a). A DL_{50} corresponde a dose da substância que se estima que cause a morte de 50% dos animais da pesquisa. Estudos de toxicidade aguda dão suporte e devem ser realizados anteriormente à Fase 1 da Pesquisa Clínica (ANVISA, 2013).

2.2.1.1. Desenho Experimental da Toxicidade Aguda

O desenho experimental deste estudo para a pesquisa do potencial tóxico agudo foi baseado no protocolo “*Acute oral toxicity – Up and down procedure*” (OECD, 2008a).

A via de administração recomendada é aquela que é pretendida para consumo humano. No caso da substância teste ser consumida via oral, preconiza-se a utilização da gavagem nos animais experimentais. A espécie animal de primeira escolha é o rato, embora também possam ser utilizadas outras espécies de roedores. Os protocolos recomendam a utilização de fêmeas, sendo que estas devem ser nulíparas, não prenhas, jovens (8 a 12 semanas de idade) e saudáveis.

A dose empregada para iniciar o teste deve ser decidida com base em estudos anteriores com a mesma substância ou então com base em testes com substâncias de estrutura química similar. Quando há informação indicativa de que o material de ensaio é de baixa toxicidade, deve-se utilizar como limite do teste a dose de 2000 mg/kg. A dose deverá ser administrada aos animais, um animal por vez, de forma sequencial, até que se obtenha um número de cinco animais tratados e assim seja possível calcular a DL₅₀.

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. 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 mg/kg). Se nenhuma estimativa da letalidade da substância está disponível, a dosagem deve ser iniciada com 175 mg/kg.

Os animais devem ser observados periodicamente ao longo de 14 dias após receberem a substância teste. Todos os sinais clínicos devem ser sistematicamente anotados, levando-se em conta os cinco parâmetros do *screening* hipocrático (MALONE; ROBICHAU, 1962), descritos abaixo:

- 1) Estado Consciente: é avaliado através da observação da atividade geral do animal dentro da caixa;
- 2) Atividade e Coordenação do Sistema Motor: é avaliada através da resposta ao toque, da resposta do aperto da cauda, do endireitamento e da força para agarrar do animal;
- 3) Reflexos: são avaliados através da resposta ao estímulo auricular e corneal;
- 4) Atividades sobre o sistema nervoso central: avaliadas através da observação de tremores, convulsões, cauda em straub, sedação e/ou anestesia;
- 5) Atividades sobre o sistema nervoso autônomo: avaliadas através da observação de lacrimação, cianose, ptose, salivação e/ou piloereção.

Além da observação dos parâmetros hipocráticos, os animais também devem ser monitorados quanto ao consumo de água e ração e peso corporal. Ao final do período de observação, todos os animais devem ser submetidos à eutanásia e autopsiados (ANVISA, 2013).

2.2.2. Toxicidade Subcrônica

O teste de toxicidade subcrônica é um ensaio realizado em roedores que tem o objetivo de caracterizar o perfil de toxicidade de uma substância através da administração desta, repetidas vezes, a grupos de animais por um determinado período de tempo (ANVISA, 2013). O tempo de tratamento nos estudos de toxicidade subcrônica é variável, dependendo do tempo de exposição humana à substância teste. Usualmente, os protocolos recomendam a administração da substância sob investigação aos animais por 28 ou 90 dias consecutivos (OECD, 2008b).

É possível, através de testes de toxicidade subcrônica, 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 da 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. Os dados de segurança obtidos em testes de toxicidade subcrônica dão suporte às Fases 1, 2 e 3 da Pesquisa Clínica (ANVISA, 2013).

2.2.2.1. Desenho Experimental da Toxicidade Subcrônica

O desenho experimental deste estudo para a pesquisa do potencial tóxico subcrônico foi baseado no protocolo “*Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents*” (OECD, 2008b).

Similarmente à toxicidade aguda, a via de administração recomendada é aquela pretendida para o consumo humano e a espécie animal de primeira escolha é o rato. Os grupos experimentais devem ser compostos por cinco machos e cinco fêmeas, de animais adultos jovens e saudáveis. E, adicionalmente, deve-se estabelecer um grupo controle negativo, que receberá somente o veículo da formulação e um grupo satélite, que será mantido em observação por mais duas semanas.

As doses empregadas em estudos subcrônicos são, em geral, estabelecidas com base na DL₅₀, respeitando-se, sempre, 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 vistas a evidenciar uma correlação dose-resposta.

A substância teste deve ser administrada aos animais diariamente durante 28 dias consecutivos. O volume de líquido administrado por dia não deve exceder 2 mL/100g de peso corporal. A variabilidade do volume de ensaio será 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.

Ao longo do período de tratamento, os animais precisam ser diariamente observados quanto aos parâmetros do *screening* hipocrático, consumo de água, consumo de ração e peso corporal. 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 devem ser quantificados, uma vez que o sistema hematopoiético é alvo de substâncias tóxicas. Determinações bioquímicas devem ser realizadas com o intuito de investigar possíveis efeitos tóxicos nos tecidos e, especificamente, efeitos nos rins e fígado. Todos os animais do estudo devem ser submetidos à autopsia detalhada que inclua o exame da superfície externa do corpo, orifícios e órgãos internos. 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.

2.2.3. Genotoxicidade

A genotoxicidade, também conhecida como toxicidade genética, é uma área da toxicologia que verifica se a substância sob investigação apresenta potencial de causar dano ao material genético (QUEIROZ et al., 2013). Esse dano pode ser quantificado por testes *in vitro* e *in vivo* através da observação de lesão gênica, mutação gênica ou alteração cromossômica (ANVISA, 2013).

A avaliação da toxicidade genética não pode ser considerada como uma medida final de carcinogenicidade. Entretanto, seus resultados são frequentemente utilizados como um

indicativo para a possibilidade de desenvolvimento de câncer, uma vez que os testes medem um evento inicial ou intermediário da tumorigênese (RIBEIRO et al., 2003).

Várias plantas com importante uso etnofarmacológico e alimentar foram avaliadas quanto ao potencial genotóxico nos últimos vinte anos. Das plantas estudadas, há relatos de atividade genotóxica em 28,4% dos casos. Esta alta incidência de resultados positivos reforça a necessidade de avaliações toxicológicas genéticas de plantas e seus derivados com interesse nutricional e medicinal (SPONCHIADO et al., 2016).

2.2.3.1. Lesão Gênica

Quando se trata de estudos de lesões gênicas, é importante ressaltar que estas, após serem processadas pelo organismo, são ainda passíveis de correção pelo sistema de reparo do DNA. Dessa forma, uma lesão detectada pode ou não resultar em uma mutação (RIBEIRO et al., 2003).

O método mais conhecido, sensível e confiável para detectar rupturas de cadeia no DNA é o ensaio cometa. Diversos pesquisadores têm aplicado a versão alcalina do teste na área da genética toxicológica, avaliando a genotoxicidade de diversos compostos. Esta técnica pode ser aplicada a qualquer material biológico que forneça células eucarióticas para análise (ROJAS et al., 1999; OECD, 2014a).

2.2.3.1.1. Desenho Experimental de Lesão Gênica

O desenho experimental deste estudo para a pesquisa do potencial genotóxico foi baseado no protocolo “*In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*” (OECD, 2014a).

Para a realização do ensaio cometa, recomenda-se a utilização de roedores adultos jovens (6 a 10 semanas) e saudáveis. Os grupos devem ser compostos por cinco animais de cada sexo, incluindo grupos de controle positivo e controle negativo. O tratamento dos animais deve ser realizado com a administração de doses diárias da substância teste por um período de tempo que garanta que a substância sob investigação atinja o tecido alvo. O tempo mínimo de tratamento recomendado é de dois dias.

Se existirem estudos preliminares com a substância a ser testada, estes estudos devem ser utilizados como base para escolha das doses. Para uma substância que se espera não ser tóxica, em um período de tratamento de 14 dias ou mais, a dose máxima permitida a ser

administrada é 1000 mg/kg/dia. Para períodos de tratamento inferiores a 14 dias, a dose máxima permitida estende-se para 2000 mg/kg/dia.

Observações clínicas gerais relacionadas à saúde dos animais devem ser feitas e registradas pelo menos uma vez por dia. Para estudos de duração mais longa, todos os animais devem ser pesados no início do estudo, semanalmente e ao final do estudo. O consumo hídrico e de ração deve ser medido pelo menos semanalmente. Os animais que exibirem indicadores não-letais de toxicidade devem ser submetidos à eutanásia antes da conclusão do período de teste.

Após o período de tratamento, os tecidos de interesse devem ser preparados e as suspensões celulares transferidas para lâminas com agarose. O ensaio cometa se baseia na organização do DNA no interior do núcleo celular. As células embebidas em agarose passam por processo de desnaturação e lise de membranas e então são submetidas a uma eletroforese. Dessa maneira, qualquer fragmento de DNA que tenha sido lesionado através de quebra terá um peso menor e, por conseguinte, sairá da sua posição celular original e migrará junto com a corrente elétrica. A intensidade da migração, portanto, refletirá a quantidade de material lesionado (COOK et al., 1976; OECD, 2014a). Os fragmentos que são transportados pela eletroforese resultam em uma imagem que remete a um cometa, com cabeça e cauda, originando assim o termo ensaio cometa (KLAUDE et al., 1996).

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 ensaio cometa é essencialmente comparativo, sendo imperativa a presença simultânea de controle positivo e negativo (RIBEIRO et al., 2003).

Para cumprir os requisitos de bem-estar animal, em particular a redução do uso de animais, este ensaio foi integrado com o estudo de toxicidade subcrônica.

2.2.3.2. Mutação Gênica

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 (DOLL; PETO, 1981). De lá para cá, diversos ensaios vêm sendo padronizados para detectar, *in vitro* e *in vivo*, o potencial mutagênico de compostos.

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 mutagenicidade, sendo amplamente aceito pelas agências internacionais de regulação (OECD, 2014b).

Resumidamente, o teste do micronúcleo tem como princípio avaliar o efeito genético da substância teste sobre a formação de micronúcleos que sejam constituídos por material cromossômico da célula precursora. O micronúcleo representa perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou danos no aparelho mitótico (RIBEIRO et al., 2003). 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 que tenha sido formado permanece na célula. Dessa maneira, um aumento na frequência de eritrócitos policromáticos com micronúcleo é indicativo de dano cromossômico induzido e repassado (OECD, 2014b).

As características básicas deste 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 (RIBEIRO et al., 2003).

2.2.3.2.1. Desenho Experimental de Mutação Gênica

O desenho experimental deste estudo para a pesquisa do potencial mutagênico foi baseado no protocolo “*Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*” (OECD, 2014b).

De maneira similar ao ensaio cometa, o teste do micronúcleo é realizado em animais de ambos os sexos, preferencialmente roedores. Recomenda-se o uso de ratos ou camundongos, embora qualquer espécie de mamíferos possa ser utilizada. Os grupos devem ser compostos por um mínimo de cinco animais de cada sexo. Grupos controle positivo e negativo, de ambos os sexos, devem ser incluídos no estudo e manuseados de maneira idêntica aos animais tratados.

Os animais devem ser expostos à substância teste através de uma via apropriada, recomenda-se a gavagem quando esta via for a pretendida para consumo humano. A dose limite permitida é de 2000 mg/kg/dia para tratamentos de até 14 dias e 1000 mg/kg/dia para tratamentos superiores a 14 dias.

Ao final do período de tratamento, a medula óssea dos animais é coletada através do fêmur, preparada e corada. A medula óssea é o tecido alvo para danos genéticos neste teste,

uma vez que os eritrócitos são produzidos neste tecido. Para cada lâmina preparada deve ser analisado um total de 2000 células, sendo que a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados é o principal ponto final observado.

A medição de micronúcleos em amostras de sangue periférico é também aceitável, entretanto somente em situações em que o pesquisador forneça uma forte justificativa científica para uso dessa amostra biológica e que comprove que a ação esplênica dos animais não esteja interferindo na frequência de células micronucleadas observadas.

Para cumprir os requisitos de bem-estar animal, em particular a redução do uso de animais, este ensaio foi integrado com o estudo de toxicidade subcrônica.

2.2.4. Toxicologia do Desenvolvimento

A toxicologia do desenvolvimento é a ciência que estuda os efeitos que ocorrem nos organismos em desenvolvimento após a exposição dos progenitores a quaisquer substâncias adversas. Essa exposição pode ser antes da concepção, durante o período pré-natal ou durante a lactação. A toxicologia do desenvolvimento engloba ainda a teratologia e a toxicidade reprodutiva (OGA et al., 2008).

A teratologia é a ciência que estuda as causas, os mecanismos e os padrões de desenvolvimento anormal. Neste contexto, um agente teratogênico é definido como “qualquer substância, organismo, agente físico ou estado de carência que, estando presente durante a vida embrionária ou fetal, produz uma alteração na estrutura ou função da descendência” (OPITZ; GILBERT, 1982). Os estudos de toxicidade reprodutiva são aqueles que têm como objetivo revelar algum efeito de determinada substância na reprodução (ANVISA, 2013), ou seja, estudar a interferência de um agente tóxico na capacidade reprodutiva de animais (EPA, 1991).

Antigamente, acreditava-se que os fetos estariam perfeitamente protegidos de todos os agentes externos pela barreira placentária e pelo próprio útero da mãe. No entanto, em 1941 foram publicados os primeiros casos documentados de que o vírus da rubéola poderia provocar perturbações graves no desenvolvimento fetal (MOORE; PERSAUD, 2008). Sequencialmente, no início dos anos 60, através da tragédia da talidomida, o conceito de “barreira placentária” foi definitivamente abalado (LIMA, 2014).

A talidomida, na época comercializada como antiemética para gestantes, afetou mais de 10 mil crianças ao redor do mundo. Sabe-se, hoje, que a exposição materna a uma única dose da medicação durante toda a gestação já é suficiente para causar efeitos deletérios aos

fetos. Os principais efeitos relatados da época são malformação dos intestinos, defeitos auditivos, ausência das orelhas, anormalidades oculares e encurtamento dos membros. Os mecanismos teratológicos associados à talidomida ainda não são completamente elucidados, porém sabe-se do envolvimento da ação anti-angiogênica (SMITHELLS; NEWMAN, 1992).

Após a tragédia da talidomida, os testes de toxicidade do desenvolvimento começaram a ganhar visibilidade na comunidade científica. Hoje se sabe que alterações causadas em período embriofetal podem ocasionar diversos desdobramentos futuros, como a perda de gestação, produção de malformações (ex. microcefalia), produção de alterações funcionais (ex. retardo do crescimento) ou distúrbios neurocomportamentais (ex. retardo mental). Diversos agentes estão relacionados com a teratologia: agentes infecciosos (ex. citomegalovírus, *Toxoplasma gondii*), agentes químicos (ex. warfarina, álcool, ácido valproico), agentes físicos (ex. raios-x, radiação atômica) e também espécies vegetais (ex. boldo, poejo, hortelã) (LIMA, 2014).

Os testes de avaliação do ciclo reprodutivo e teratogenicidade são previstos por diversas agências regulatórias ao redor do mundo. Por serem testes de alta complexidade, são classicamente divididos em três segmentos (LIMA, 2014):

Segmento I. Também conhecido como estudo da fertilidade. Compreende o período do pré-acasalamento até a implantação do blastocisto no útero. É o segmento que permite avaliar a fertilidade e desempenho reprodutivo dos progenitores.

Segmento II. Também conhecido como **toxicologia do desenvolvimento ou teratologia**. Compreende o período crítico da gestação: a organogênese. É o segmento que permite avaliar a embriotoxicidade e a teratogênese, segmento estudado na presente tese.

Segmento III. Também conhecido como estudo perinatal e pós-natal. Compreende o final da gestação até a idade adulta do período pós-natal. Permite avaliar alterações na progênie exposta na fase de desenvolvimento fetal e lactação.

Além da avaliação reprodutiva, em todos os segmentos procede-se também com a avaliação da toxicidade materna. Muitas alterações fisiológicas no organismo gestante podem influenciar o metabolismo e excreção de substâncias químicas. A diminuição da motilidade intestinal, o aumento da retenção de líquidos e as modificações hormonais, por exemplo, podem afetar as propriedades farmacocinéticas de compostos químicos, podendo levar assim a uma resposta expressiva em um organismo gestante, quando comparado a um não gestante. Além disso, o ganho insuficiente de massa corporal em uma fêmea gestante pode acarretar em restrição de crescimento intrauterino ou comprometer a ossificação do feto (LIMA, 2014).

Estudos comparativos mostram que agentes que causam toxicidade do desenvolvimento em humanos frequentemente produziram efeitos similares em estudos experimentais realizados com animais, demonstrando assim a importância preditiva dos testes de toxicidade do desenvolvimento (EPA, 1991). De uma maneira geral, a positividade em qualquer teste de cunho reprodutivo, em qualquer espécie, exclui a utilização do produto na espécie humana, durante a gravidez (SIMÕES et al., 2010).

2.2.4.1. Desenvolvimento Embrionário

Para entender a importância do estudo do ciclo reprodutivo em segmentos, é preciso também entender as particularidades de cada etapa reprodutiva. Dentro do contexto experimental, também é importante que se esclareça os motivos da escolha da espécie animal. Portanto, neste tópico será abordada a temática de desenvolvimento embrionário da espécie humana e sua comparação animal.

Humanos e ratos de laboratório apresentam muitas similaridades na fisiologia e comportamento reprodutivo, principalmente no que concerne a funcionalidade endócrina. Muitas dessas similaridades não são compartilhadas por outras espécies de mamíferos, o que torna o rato a espécie ideal para estudos que envolvam função reprodutiva e do desenvolvimento (GRAY et al., 2004).

Fisiologicamente, tanto a função reprodutiva de ratos quanto a de humanos envolve a integração dos sistemas neuroendócrino, nervoso central e ovários, constituindo o eixo hipotalâmico-hipofisário-gonadal. Os hormônios são necessários para induzir o implante do blastocisto no útero, manter a gravidez, induzir o parto e a lactação e estimular o comportamento materno-reprodutivo (GRAY et al., 2004).

Em ambas as espécies animais, a função reprodutora feminina é dividida em duas principais fases: a preparação do corpo para a gestação e a gestação propriamente dita (GOPINATH, 2013). A preparação para a gestação envolve, repetidamente, diversos aspectos fisiológicos, tais como: flutuação hormonal equilibrada, liberação de gametas viáveis e alterações morfológicas e bioquímicas do útero com vistas a efetuar o transporte adequado do óvulo e espermatozoide (LIMA, 2014). Já um organismo gestante, depende essencialmente da manutenção adequada dos níveis de progesterônios e estrogênios (ALMEIDA, 2009).

O útero humano e o útero de ratas são anatomicamente diferentes. O útero humano é caracterizado apenas por um estreitamento inferior seguido da cérvix, que se abre na vagina (GOPINATH, 2013). O útero de ratas, e roedores em geral, é um órgão em forma de Y,

constituído por dois alongados cornos uterinos. Esse formato anatômico ocorre para que seja possível acolher o elevado número de filhotes produzidos em uma gestação de roedores (ALMEIDA, 2009; GOPINATH, 2013).

Em mulheres, a efetiva duração da fertilidade a cada ciclo menstrual varia entre 24 e 48 horas e a viabilidade dos espermatozoides após o coito é de 48 a 60 horas. Enquanto isso, em ratas, a cada ciclo estral, o período de efetiva fertilidade é de aproximadamente 14 horas e a viabilidade espermática do rato é de até 17 horas (LIMA, 2014).

Na mulher, o folículo ovariano rompe-se para possibilitar a ovulação. As paredes do folículo, sob a influência do LH, se modificam em corpo lúteo, que secreta progesterona e estrogênio. Se há a fecundação do ovócito, o corpo lúteo aumenta de tamanho e forma o corpo lúteo gravídico. A produção de gonadotrofina coriônica humana impede a degeneração do corpo lúteo. Se não há a fecundação do ovócito, o corpo lúteo involui e degenera, formando, posteriormente, o corpo albicans (MOORE; PERSAUD, 2008). A duração de um ciclo menstrual típico é de 28 dias, enquanto que a duração média de um ciclo estral de ratas é de 4 a 5 dias (LIMA, 2014).

O sítio de fecundação usual em humanos é a ampola da tuba uterina. Não havendo fecundação, o ovócito migrará para o útero e será degenerado. Se houver fecundação, ocorre a combinação dos cromossomos dos progenitores na metáfase da primeira divisão mitótica do zigoto (célula totipotente altamente especializada). O zigoto sofre novas clivagens consecutivas. As duas primeiras células filhas chamam-se blastômeros. A união de 12 a 32 blastômeros forma a mórula. Quatro dias após a fecundação, a mórula alcança o útero, sendo então chamada de blastocisto, momento em que este se adere superficialmente a parede uterina (MOORE; PERSAUD, 2008). O intervalo temporal entre a fecundação e o implante superficial do blastocisto no útero em ratas é de quatro a seis dias; enquanto que em humanos é entre o sétimo e o décimo segundo dia (GRAY et al., 2004; ALMEIDA, 2009).

As fêmeas de ratos e humanos compartilham também o mesmo tipo de placenta, denominada hemocorial. Esse tipo corresponde à placenta de maior proximidade entre mãe e feto, apresentando íntimo contato entre corion fetal e sangue materno. Essa característica facilita a passagem de diversas substâncias da circulação materna para o feto (FURUKAWA et al., 2011). O transporte placentário exerce importante papel na manutenção de uma gestação saudável, através de complexa rede de transportadores membranares. Muitos compostos, incluindo plantas medicinais, podem afetar o transporte placentário e alcançar o feto, aumentando o risco de teratogenicidade (MOURA, 2016).

Na sequência do implante, ocorre a gastrulação, processo que, resumidamente, é a formação das três camadas germinativas que são precursoras de todos os tecidos embrionários. Neste ponto é estabelecido o início da morfogênese, o desenvolvimento da forma e estrutura do corpo e em sequência da organogênese (MOORE; PERSAUD, 2008).

Na mulher, o período gestacional compreende uma média de 270 dias e é chamado de gravidez. Na rata, o período gestacional compreende uma média de 21 dias e é denominado prenhez (ALMEIDA, 2009). Embora a nomenclatura e tempo de gestação sejam distintos, os períodos que compreendem a gestação são comuns as duas espécies, sendo eles: (1) pré-implante, (2) organogênese e (3) desenvolvimento fetal (MOORE; PERSAUD, 2008).

A fase de pré-implante compreende o período que vai desde a fecundação do ovócito até a firme implantação do blastocisto no útero materno. Em humanos, a implantação ocorre antes da segunda semana de desenvolvimento, enquanto que em ratos vai até o 5º dia (MOORE; PERSAUD, 2008). Nesta fase, o embrião é muito sensível a ação de qualquer substância química. Entretanto, essa sensibilidade parece estar muito mais relacionada à letalidade (aborto) do que a teratogenicidade (RODRIGUES et al., 2011).

O segundo período gestacional, a organogênese, inicia com a implantação do blastocisto no útero, sendo que vai do final da primeira semana até a oitava semana pós-fecundação em mulheres e em ratas do 6º até o 15º dia de prenhez (MOORE; PERSAUD, 2008). A fase da organogênese é caracterizada por intensa proliferação celular, diferenciação tecidual e formação rudimentar das estruturas corporais (GRAY et al., 2004). O risco teratológico existe durante todo período gestacional, porém é maior na fase da organogênese. Essa fase é a mais suscetível a embriotoxicidade ou malformações, sendo considerada como o período teratogênico clássico (RODRIGUES et al., 2011).

A fase do desenvolvimento fetal corresponde ao período final da gestação, em que o feto está inteiramente formado, porém ainda há diferenciação do sistema nervoso central, maturação fisiológica dos diferentes sistemas e crescimento ponderal do feto. Em humanos compreende oito semanas completas pós-fertilização até o nascimento e em ratos do 16º dia até o nascimento (MOORE; PERSAUD, 2008). Neste período, a sensibilidade frente a malformações anatômicas é consideravelmente menor, porém a exposição à xenobióticos ainda pode resultar em efeitos deletérios de ordem funcional a alguns sistemas. Em especial, são alvos desse período o sistema nervoso central, sistema endócrino e sistema imunológico (RODRIGUES et al., 2011).

Considera-se que a maioria das drogas capazes de produzir efeitos deletérios ao sistema reprodutor atua a nível metabólico de maneira direta (através de inibição enzimática,

mutação gênica ou intervenção em mitoses). Porém, podem atuar também de maneira indireta, através de ação tóxica sobre a mãe, sobre a placenta ou sobre os vasos umbilicais (BENZECRY et al., 2001).

Gestantes, culturalmente, constituem um grupo populacional que com frequência recorre ao uso de derivados de plantas para o tratamento de doenças. Considerando este cenário, é necessária a preocupação em conhecer os possíveis efeitos adversos dos produtos consumidos, para que se evitem riscos para a mãe e feto.

2.2.4.2. Plantas Medicinais e Toxicidade Reprodutiva

Diversos produtos de origem vegetal podem promover prejuízos aos órgãos reprodutivos ou ao sistema endócrino quando consumidos de maneira indiscriminada. Em função dos efeitos tóxicos, esses produtos podem ser categorizados em abortivos, teratogênicos ou embriotóxicos (ARCANJO et al., 2014; VIEL, 2016).

Muitas plantas consumidas rotineiramente no Brasil estão relacionadas com processos de abortamento. A arruda (*Ruta graveolens* L. – uso de folhas na dose de 10 mg/kg), a artemísia (*Artemisia vulgaris* – uso de folhas na dose de 6000 mg/kg), a calêndula (*Calendula officinalis* – uso das flores, folhas e caules) e o funcho (*Foeniculum vulgare* Miller – uso das sementes, frutos e raízes) são exemplos de plantas empregadas no uso popular com finalidades emenagogas e que apresentam como atividade biológica a indução do aborto. Há evidências de que o ascaridol, a boldina, a rutina e a tujona sejam os principais constituintes químicos responsáveis pela atividade abortiva nestas espécies (MOURA, 2008).

O chá obtido das flores da camomila (*Matricaria recutita*) é amplamente empregado na etnofarmacologia com finalidades sedativas e ansiolíticas (SOUSA et al., 2008). Sua composição química, propensa ao efeito calmante, afeta também o sistema reprodutor feminino através do relaxamento uterino, podendo, dessa forma, induzir o aborto (MOURA, 2008).

Ainda em relação a plantas com potencial abortivo, Rodrigues e colaboradores relatam que as folhas da angélica (*Angelica archangelica*), as folhas da sucúuba (*Himantus succuba*), as folhas e galhos do alecrim (*Rosmarinus officinalis*), as folhas da arnica (*Arnica montana*), as cascas da cânfora (*Cinnamomum canphora*), as folhas do confrei (*Symphytum officinale* L.) e as folhas do eucalipto (*Eucalyptus globulus*) são capazes de estimular a motilidade uterina, ocasionando, dessa forma, quadros de abortos (RODRIGUES et al., 2011).

Todas as plantas mencionadas são muito conhecidas na medicina popular e tem seu uso bem estabelecido. A angélica é empregada como anticoagulante. A sucuúba é usada na prevenção e tratamento de gastrite e úlcera. O alecrim apresenta efeitos estimulantes, antissépticos, antifúngicos e antimicrobianos. A arnica é empregada dermicamente em contusões, hematomas e distensões musculares. A cânfora tem uso como antisséptico e sedativo. O confrei, topicamente é usado para psoríase, queimaduras e fissuras. O eucalipto é amplamente empregado no tratamento de inflamações pulmonares e mucosidade excessiva (RODRIGUES et al., 2011).

Arcanjo e colaboradores adicionam a essa lista o popular quebra-pedra (*Phyllanthus niruri*), enfatizando que o processo de abortamento ocorre por hemorragia grave. Foram consideradas como abortivas as folhas, as flores e os frutos desta espécie (ARCANJO et al., 2014).

Algumas espécies vegetais são conhecidas popularmente por apresentarem atividades laxativas. A seiva obtida das folhas da babosa (*Aloe spp.*), a casca seca da cáscara-sagrada (*Rhamnus purshiana DC.*), as folhas do sene (*Cassia angustifolia* e *Cassia acutifolia*) e as raízes do ruibarbo (*Rheum palmatum*) mostram-se eficientes laxantes, entretanto também apresentam efeitos abortivos. Acredita-se que essas atividades abortivas estejam relacionadas com alguns constituintes químicos tais como aloe-emodina, aloína, barbaloina e emodina (MOURA, 2008).

O barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum*) é popularmente empregado com finalidades antimicrobianas. O extrato obtido de suas sementes foi testado em ratas grávidas na dose de 500 mg/kg e ocasionou diminuição do peso dos órgãos reprodutivos e atrofia dos corpos lúteos, sendo, a partir de então, considerado como embriotóxico (VITRAL et al., 1987). Além dele, há relatos de efeitos embriotóxicos para as raízes secas de videira trovão de Deus (*Tripterygium wilfordii*, nas doses de 50 e 100 mg/kg) e para as folhas de *Rhazya stricta* (sem nome popular descrito, nas doses de 500 e 1000 mg/kg), sendo a primeira planta empregada no tratamento do lúpus e síndrome nefrótica e a segunda em diabetes e quadros inflamatórios (RODRIGUES et al., 2011).

Estudos realizados em ratas apontam que algumas plantas, comumente utilizadas com finalidades digestivas, também apresentam potencial embriotóxico e teratogênico. As folhas do boldo (*Vernonia condensata*) ocasionaram retardo de crescimento fetal quando administradas em doses de 0,5 a 2000 mg/kg. As folhas do boldo do Chile (*Peumus boldus*) apresentaram efeitos teratogênicos significativos associados à toxicidade materna, quando administradas em doses de 880 mg/kg. Já as raízes do gengibre (*Zingiber officinale*), na dose

1000 mg/kg, mostraram correlação entre exposição pré-natal e perda fetal (RODRIGUES et al., 2011).

Rocha e colaboradores, em 2012, avaliaram a toxicidade da casca-doce (*Pradosia huberi* Ducke) em ratos Wistar, visto seu consumo etnofarmacológico em quadros de úlceras e gastrites. Os resultados obtidos apontaram que o extrato hidroalcoólico extraído da casca compromete a capacidade reprodutiva durante a fase inicial da prenhez, sugerindo um possível efeito embriotóxico em todas as doses testadas (1,22, 6,1 e 30,5 mg/kg) (ROCHA et al., 2012).

Tropaeolum majus L. é uma planta nativa dos Andes na América do Sul amplamente distribuída em todo o mundo. No Brasil, é popularmente conhecida como capuchinha e é utilizada como diurética e anti-hipertensiva. Um estudo investigou se o extrato etanólico das folhas da espécie pode afetar o desenvolvimento embrionário em ratos Wistar. Significativas perdas pré-implantação foram observadas em todas as doses utilizadas (3, 30, e 300 mg/kg) (BOTELHO LOURENÇO et al., 2014).

O honokiol é um componente bioativo isolado da casca da magnólia (*Magnolia officinalis*), que tem uso etnofarmacológico como antimicrobiano, anti-inflamatório e neuroprotetor. Animais foram tratados com diferentes doses do composto e, na dose de 2000 µg/kg, foram observadas toxicidade embrionária e diminuição do comprimento corporal dos fetos (ZHANG et al., 2016).

Os possíveis efeitos reprodutivos do óleo essencial do orégano (*Origanum vulgare* L.) foram recentemente investigados em ratos Wistar. Os resultados demonstraram que o tratamento parental com o óleo (na dose de 27% vol/vol) apresentou potencial para afetar índices reprodutivos, resultando em perdas pós-implantação e alterações esqueléticas nos fetos de mães tratadas (HOLLENBACH et al., 2017).

A *Momordica charantia* L., popularmente conhecida no Brasil como melão de São Caetano, destaca-se por suas propriedades terapêuticas, sendo extensivamente utilizada na medicina popular para o tratamento da diabetes. O extrato seco das folhas da espécie foi testado em ratos Wistar e os resultados sugerem o desenvolvimento de toxicidade materna nas doses de 500, 1000 e 2000 mg/kg (TRAUTENMULLER et al., 2017).

A andiroba (*Carapa guianensis* Meliaceae), árvore comum na região amazônica, é popularmente empregada com finalidades analgésicas e antiinflamatórias. O óleo obtido de suas amêndoas foi testado durante a prenhez em ratos Wistar. O tratamento oral (doses de 0,375, 0,75, 1,5 e 3 g/kg) não resultou em anormalidades nos parâmetros analisados, indicando segurança de uso durante a gestação (COSTA-SILVA et al., 2007).

O óleo de cártamo é extraído das sementes da *Carthamus tinctorius*, planta cultivada em todo o mundo devido às suas propriedades medicinais. Para investigação dos efeitos teratogênicos, o óleo foi pré-aquecido (mimetizando o consumo culinário humano) e administrado oralmente a ratas prenhas. Os resultados apontam que a dose de 0,30 mL foi capaz de causar malformações severas em 21,73% dos fetos analisados, enquanto que a taxa de malformações do grupo controle foi de apenas 5,6% (INDART et al., 2002).

Outro óleo comestível bastante empregado na medicina popular é o óleo obtido a partir das amêndoas de neem (*Azadirachta indica*). Estudos realizados com o óleo de neem demonstraram importantes efeitos sobre a capacidade reprodutiva de ratas Wistar. Há relatos de efeitos abortivos (doses de 4 a 6 mL/kg), efeitos fetotóxicos (doses de 1 a 2 g/kg) e perturbações do ciclo estral (doses de 2 a 4,6 mL/kg). Autores afirmam que uma ingestão diária a partir de 0,14 mL de óleo para um adulto de 70 kg já é capaz de ocasionar efeitos reprodutivos graves (BOEKE et al., 2004).

O óleo popularmente conhecido como óleo de copaíba é extensivamente utilizado na medicina natural e pode ser extraído de diferentes espécies do gênero *Copaifera*. Estudo realizado em 2009 buscou elucidar os efeitos do óleo extraído da espécie *Copaifera langsdorfii* em relação aos efeitos tóxicos maternos e teratogênicos. Os autores administraram três doses do óleo (0,3, 0,6 e 0,9 mL/kg) à fêmeas de camundongos durante o período gestacional. Os resultados indicaram que o óleo não apresentou toxicidade materna ou teratogenicidade na prole (LOURENÇO et al., 2009). Entretanto, outro estudo, dessa vez realizado com o óleo de copaíba obtido da espécie *Copaifera multijuga* Hayne, mostrou resultados divergentes. Os autores relatam que o tratamento com doses de 200, 500 e 2500 mg/kg do óleo resultou em diminuição significativa do peso corporal das mães e dos fetos, além de diminuição do comprimento fetal. Dessa forma, afirmam que o tratamento resultou em toxicidade materna e embriotoxicidade (GONÇALVES, 2014).

2.2.4.3. Desenho Experimental de Toxicologia do Desenvolvimento

O desenho experimental deste estudo para a pesquisa do potencial tóxico sobre o desenvolvimento e teratogenicidade foi baseado nos seguintes protocolos: “Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos” (ANVISA, 2013), “*Guidelines for Developmental Toxicity Studies*” (FDA, 2000), “*Guidelines for Developmental Toxicity Risk Assessment*” (EPA, 1991) e “*Prenatal Developmental Toxicity Study*” (OECD, 2001). Embora existam

pequenas variações entre os protocolos mencionados, de uma maneira geral, todos são similares e se complementam.

Os protocolos iniciam preconizando a importância do conhecimento do ciclo estral dos animais (vide Tabela 1 dos dados complementares, página 102). Todas as fêmeas são submetidas diariamente à avaliação microscópica de lavado vaginal, a fim de determinar sua fase estral. Quando detectado o proestro, a fêmea é colocada na presença de macho comprovadamente fértil. Na manhã seguinte, o esfregaço vaginal é feito, e, apresentando espermatozoides, é considerado o dia zero (d0) da gestação. Os acasalamentos são repetidos até a obtenção do número suficiente de progenitoras em cada grupo.

As fêmeas prenhas são aleatoriamente divididas em três grupos experimentais e grupo controle. Elas são tratadas na fase de pós-implantação do blastocisto no útero, na fase teratogênica clássica: a organogênese, que corresponde do d6 até o d15 de prenhez, uma vez ao dia.

Em relação aos grupos experimentais, os protocolos sugerem três grupos de exposição à substância teste, em três doses diferentes, e um grupo de controle negativo. A escolha das doses segue o mesmo princípio dos testes anteriores: uma que produza efeitos tóxicos, outra em que os animais não manifestem qualquer alteração e uma terceira, intermediária entre as anteriores, não excedendo a dose máxima diária de 1000 mg/kg/dia.

Durante o tratamento, as fêmeas são observadas quanto a sinais de toxicidade, seguindo o *screening* hipocrático. São acompanhadas, também, em relação ao peso corporal, consumo de água e consumo de ração. Ao final do tratamento, para seguir avaliando a toxicidade materna, são coletados o sangue e órgãos das mães. Com os materiais, são mensuradas variáveis hematológicas, bioquímicas e feito o processamento histopatológico. A avaliação da toxicidade materna é um ponto fundamental empregado nos protocolos convencionais de avaliação de toxicidade do desenvolvimento. Essa avaliação permite visualizar com maior exatidão os efeitos da substância teste não somente no organismo fetal, mas também na fisiologia reprodutiva da mãe, o que pode levar aos efeitos tóxicos no feto.

Para avaliar a performance reprodutiva, as fêmeas devem ser submetidas à cesariana um dia antes do que seria o parto natural. Sabendo que a gestação média de uma rata compreende 21 dias, usualmente a cesariana é realizada no d20 de prenhez. Neste momento, avalia-se o número de corpos lúteos, de implantes uterinos, de reabsorções visíveis, de fetos vivos e mortos e de suas respectivas placentas. Após a laparotomia, os fetos são pesados, analisados macroscopicamente e então processados para a análise esquelética e visceral.

3. OBJETIVOS

GERAL

Avaliar a toxicidade pré-clínica do óleo da polpa do *Caryocar brasiliense* (OPCB) em ratos Wistar.

ESPECÍFICOS

Determinar o perfil de ácidos graxos do OPCB, através de cromatografia gasosa acoplada a espectrômetro de massas;

Quantificar os principais carotenoides do OPCB, através de cromatografia líquida de alta eficiência;

Estimar a DL₅₀ do OPCB, através do teste de toxicidade aguda;

Verificar possíveis efeitos sistêmicos ou em órgãos-alvo do OPCB, através do teste de toxicidade subcrônica;

Verificar o potencial de letalidade do OPCB, através do teste de *Artemia salina*;

Investigar o potencial genotóxico do OPCB, através do ensaio cometa;

Investigar os potenciais efeitos mutagênicos e/ou citotóxicos do OPCB, através do teste do micronúcleo;

Analisar variáveis que indiquem toxicidade materna nas progenitoras expostas ao OPCB no período da organogênese;

Analisar variáveis que indiquem embriotoxicidade de fetos expostos ao OPCB no período da organogênese;

Avaliar variáveis que indiquem teratogenicidade (anormalidades externas e internas) de fetos expostos ao OPCB no período da organogênese.

4. CONCLUSÕES

GERAL

O óleo da polpa do *Caryocar brasiliense* (OPCB) não causou toxicidade pré-clínica em ratos Wistar.

ESPECÍFICAS

O OPCB é rico em ácidos graxos insaturados, com predominância do ácido oleico;

O OPCB é rico em carotenoides, com presença predominante de β -caroteno e licopeno;

A DL₅₀ do OPCB foi estimada sendo maior que 2000 mg/kg;

A exposição repetida ao OPCB não foi capaz de causar efeitos sistêmicos ou em órgãos-alvo nos animais tratados;

O OPCB causou baixa letalidade no teste de *Artemia salina*;

O tratamento com o OPCB não causou efeitos genotóxicos nos animais tratados;

O tratamento com o OPCB não causou efeitos mutagênicos e/ou citotóxicos nos animais tratados;

As doses testadas do OPCB não foram capazes de induzir toxicidade materna nas progenitoras expostas no período da organogênese;

O tratamento com o OPCB não causou embriotoxicidade em fetos expostos ao OPCB no período da organogênese;

O tratamento com o OPCB não causou teratogenicidade (anormalidades externas e internas) de fetos expostos no período da organogênese.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALMEIDA, J. M. **Embriologia Veterinária Comparada**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Piqui e Buriti: importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994.
- ALVES, A. I. *Obtenção de Extrato de Carotenoides de Polpa de Pequi (Caryocar brasiliense Camb.) Encapsulado pelo Método de Secagem por Atomização*. 2014. 95 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 2014.
- 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.
- 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. **Institui e normatiza o registro de produtos fitoterápicos junto ao Sistema de Vigilância Sanitária**. Portaria nº 6. Brasília, 31 de janeiro de 1995.
- ARCANJO, G. M. G.; MEDEIROS, M. L. F. S.; DE SÁ AZEVEDO, R. R.; ROCHA, T. J. M.; DE SOUZA GRIZ, S. A.; MOUSINHO, K. C. Estudo da utilização de plantas medicinais com finalidade abortiva. **Revista Eletrônica de Biologia**. v.6, n.3, p.234-250, 2014.
- BENZECRY, R.; OLIVEIRA, H. C.; LEMGRUBER, I. **Tratado de Obstetrícia Febrasgo**. Rio de Janeiro: Revinter, 2001.
- BOCHNER, R.; FISZON, J. T.; ASSIS, M. A.; AVELAR, K. E. S. Problemas associados ao uso de plantas medicinais comercializadas no Mercado de Madureira, município do Rio de Janeiro. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.14, n.3, p.537-547, 2012.
- BOEKE, S. J.; BOERSMA, M. G.; ALINK, G. M.; VAN LOON, J. J.; VAN HUIS, A.; DICKE, M.; RIETJENS, I.M. Safety evaluation of neem (*Azadirachta indica*) derived pesticides. **Journal of Ethnopharmacology**. v.94, n.1, p.25-41, 2004.
- BOTELHO LOURENÇO, E. L.; MULLER, J. C.; BOARETO, A. C.; GOMES, C.; LOURENÇO, A. C.; COLLOI PALOZI, R. A.; LIMA PRANDO, T. B.; GASPAROTTO JUNIOR, A.; DALSENTER, P. R. Effects of angiotensin-converting enzyme inhibitor derived from *Tropaeolum majus* L. in rat preimplantation embryos: evidence for the dehydroepiandrosterone and estradiol role. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**. v.2014, p.1-6, 2014.
- BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. **Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências**. Diário Oficial da República Federativa do Brasil. Brasília, DF, 23 junho de 2006.
- CAMPOS, S. C.; SILVA, C. G.; CAMPANA, P. R.; ALMEIDA, V. L. Toxicidade de espécies vegetais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.18, n.1, p.373-382, 2016.

COLOMBO, N. B.; RANGEL, M. P.; MARTINS, V.; HAGE, M.; GELAIN, D. P.; BARBEIRO, D. F.; GRISOLIA, C. K.; PARRA, E. R.; CAPELOZZI, V. L. *Caryocar brasiliense* Camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.48, n.9, p.852-862, 2015.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A.; JOST, E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. **Journal of Cell Science**. v.22, n.2, p.303-324, 1976.

COSTA-SILVA, J. H.; LYRA, M. M.; LIMA, C. R.; ARRUDA, V. M.; ARAÚJO, A. V. E.; RIBEIRO, A. R.; ARRUDA, A. C.; FRAGA, M. C.; LAFAYETTE, S. S.; WANDERLEY, A. G. A toxicological evaluation of the effect of *Carapa guianensis* Aublet on pregnancy in Wistar rats. **Journal of Ethnopharmacology**. v.112, n.1, p.122-126, 2007.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **Journal of the National Cancer Institute**. v.66, n.6, p.1192-1308, 1981.

EKOR, M. The growing use of herbal medicines: issues relating to adverse reactions and challenges in monitoring safety. **Frontiers in Pharmacology**. v.4, n.177, 2014.

ENGELKE, F. Fitoterápicos e Legislação. **Jornal Brasileiro de Fitomedicina**. v.1, n.1, p.10-15, 2003.

EPA – Environmental Protection Agency. GUIDELINES FOR DEVELOPMENTAL TOXICITY RISK ASSESSMENT. Risk Assessment Forum, Washington, DC, EPA/600/FR-91/001, 1991.

FDA – Food and Drug Administration. Redbook 2000: IV.C.9.b GUIDELINES FOR DEVELOPMENTAL TOXICITY STUDIES. Toxicological Principles for the Safety Assessment of Food Ingredients, 2000.

FURUKAWA, S.; HAYASHI, S.; USUDA, K. ABE, M.; HAGIO, S.; OGAWA, I. Toxicological pathology in the rat placenta. **Journal of Toxicologic Pathology**. v.24, n.2, p.95-111, 2011.

GODOY, H. T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of cis-Isomers of provitamin A in brazilian fruits. **Journal Agricultural Food Chemistry**. v.42, p.1306-1313, 1994.

GONÇALVES, E. S. *Avaliação da segurança de uso do óleo de Copaifera multijuga Hayne (Fabaceae)*. 2014. 140 f. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2014.

GOPINATH, C. Toxicology and pathology of female reproductive tract. **Cell Biology and Toxicology**. v.29, n.3, p.131-141, 2013.

GRAY, L. E.; WILSON, V.; NORIEGA, N.; LAMBRIGHT, C.; FURR, J.; STOKER, T. E.; LAWS, S. C.; GOLDMAN, J.; COOPER, R. L.; FOSTER, P. M. Use of the laboratory rat as a model in endocrine disruptor screening and testing. **ILAR Journal**. v.45, n.4, p.425-437, 2004.

HOLLENBACH, C. B.; STEDILE, R.; MELLO, F. P.; BING, R. S.; ROSA, P. P.; RODRIGUES, M. R.; MELLO, F. B.; ZANETTE, R. A.; MELLO, J. R. Pre-and postnatal

evaluation of offspring rats exposed to *Origanum vulgare* essential oil during mating, gestation and lactation. **Ciência Rural**. v.47, n.1, 2017.

INDART, A.; VIANA, M.; GROOTVELD, M. C.; SILWOOD, C. J.; SÁNCHEZ-VERA, I.; BONET, B. Teratogenic actions of thermally-stressed culinary oils in rats. **Free radical research**. v.36, n.10, p.1051-1058, 2002.

KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M.; PEREIRA, L. O.; OLIVEIRA, A. B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**. v.30, p.442-448, 2007.

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

LIMA, A. D.; SILVA, A. D.; TRINDADE, R. A.; TORRES, R. P.; MANCINI-FILHO, J. O. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.29, n.3, p.695-698, 2007.

LIMA, C. S. *Estudo da toxicidade não clínico em ratos submetidos ao tratamento com óleo-resina de Copaifera duckei dwyer (subcrônico e reprodutivo)*. 2014. 266 f. Tese (Doutorado em Biodiversidade Tropical) – Universidade Federal do Amapá, Amapá, 2014.

LOURENÇO, A. C. S.; MIGUEL, L. K.; GUARIDO, K. L.; SENSIATE, L. A.; SALLES, M. J. S. Óleo de copaíba (*Copaifera langsdorfii* Desf.) em padrões reprodutivos de camundongos e no desenvolvimento embriofetal. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.11, n.4, p. 407-413, 2009.

MALONE, M. H.; ROBICHAUD, R. C. A Hippocratic screen for pure or crude drugs materials. **Llordya**. v.25, n.4, p.320-331, 1962.

MIRANDA-VILELA, A. L.; PEREIRA, L. C.; GONÇALVES, C. A.; GRISOLIA, C. K. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners. **Nutrition Research**. v.28, p.850-858, 2009.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**. v.31, n.4, p.956-963, 2008.

MONTEIRO, S. S.; DA SILVA, R. R.; DA S MARTINS, S. C.; BARIN, J. S.; DA ROSA, C. S. Phenolic compounds and antioxidant activity of extracts of pequi peel (*Caryocar brasiliense* Camb.). **International Food Research Journal**. v.22, n.5, 2015.

MOORE, K. L.; PERSAUD, T. V. N. **Embriologia Clínica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

MOURA, A. L. S. *Etnofarmacologia e o período gestacional*. 2008. Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Formação de Oficiais do Serviço da Saúde) - Escola de Saúde do Exército, Rio de Janeiro, 2008.

MOURA, E. R. *Avaliação da toxicidade reprodutiva e sistêmica do látex de Himatanthus siccuba (spruce) Woodson em roedores*. 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) - Universidade Federal do Piauí, Piauí, 2016.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**. v.70, n.3, p.461-477, 2007.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 414, in: OECD (Ed.), Prenatal Developmental Toxicity Study, Paris, 2001.

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.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 489, in: OECD (Ed.), In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay, Paris, 2014a.

OECD – Organisation for Economic Co-operation and Development. Guidelines for Testing of Chemical, Guideline 474, in: OECD (Ed.), Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, Paris, 2014b.

OGA, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Editora Atheneu, 2008.

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. **Brazilian Journal of Biology**. v.71, p.283-289, 2011.

OPITZ, J. M.; GILBERT, E. F. CNS anomalies and the midline as a “developmental field”. **American Journal of Medical Genetics Part A**. v.12, n.4, p.443-455, 1982.

PALMEIRA, S. M.; SILVA, P. R.; FERRÃO, J. S.; LADD, A. A.; DAGLI, M. L.; GRISOLIA, C. K.; HERNANDEZ-BLAZQUEZ, F. J. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**. v.25, n.4, p.299-305, 2016.

PASSOS, X. S.; SANTOS, S. D.; FERRI, P. H.; FERNANDES, O. D.; PAULA, T. D.; GARCIA, A. C.; SILVA, M. D. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) against *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.35, n.6, p.623-627, 2002.

PLACIDO, G. R.; SILVA, R. M.; SILVA, M. A.; CALIARI, M.; CAGNIN, C. Physical and chemical parameters, total phenols and the antioxidant activity of Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). **African Journal of Agricultural Research**. v.10, n.6, p.534-542, 2015.

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. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.49, n.1, 2013.

RAYNOR, D. K.; DICKINSON, R.; KNAPP, P.; LONG, A. F.; NICOLSON, D. J. Buyer beware? Does the information provided with herbal products available over the counter enable safe use? **BMC Medicine**. v.9, p.1-9, 2011.

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

ROCHA, A. D.; SOUSA, L. D.; MOTA, C. D.; SANTOS, E. C.; DINIZ, M. D.; DA SILVA, M. S.; PIMENTA, M. B.; DA SILVEIRA E SÁ, R. D. Evaluation of the Toxicity of *Pradosia huberi* extract during the preimplantation in Wistar rats. **BioMed Research International**. v.2013, p.1-6, 2012.

ROCHA, M. S.; FIGUEIREDO, R. W.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.35, n.4, p.933-941, 2013.

RODRIGUES, H. G.; MEIRELES, C. G.; LIMA, J. T.; TOLEDO, G. P.; CARDOSO, J. L.; GOMES, S. L. Efeito embriotóxico, teratogênico e abortivo de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**. v.13, n.3, p.359-366, 2011.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**. v.722, n.1, p.221-254, 1999.

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

SILVA, F. H. L. *Populações, matrizes e idade da planta na expressão de variáveis físicas, químicas e físico-químicas em frutos do pequizeiro (Caryocar brasiliense Camb.)*. 2011. 52 f. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) – Universidade Federal dos Vales do Jequitinhonha e Mucuri, Diamantina, 2011.

SILVEIRA, P. F.; BANDEIRA, M. A.; ARRAIS, P. S. Pharmacovigilance and adverse reactions to the medicinal plants and herbal drugs: a reality. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.4, p.618-626, 2008.

SIMÕES, C. M. O, SHENKEL, E. P.; GOSMANN, G.; MELLO, J. C. P.; MENTZ, L. A.; PETROVICK, P. R. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6ª ed. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC, 2010.

SINITOX – Sistema Nacional de Informações Tóxico-Farmacológicas. Dados de Intoxicação – Dados Nacionais – Ano 2014. Disponível em <https://sinitox.iciet.fiocruz.br/dados-nacionais>. Acesso em 08 de setembro de 2017.

SMITHELLS, R. W.; NEWMAN, C. G. Recognition of thalidomide defects. **Journal of Medical Genetics**. v.29, n.10, p.716, 1992.

SOUSA, F. C.; MELO, C. T.; CITÓ, M. C.; FÉLIX, F. H.; VASCONCELOS, S. M.; FONTELES, M. M.; BARBOSA-FILHO, J. M.; VIANA, G. S. Plantas medicinais e seus

constituintes bioativos: Uma revisão da bioatividade e potenciais benefícios nos distúrbios da ansiedade em modelos animais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.18, n.4, p.642-654, 2008.

SPONCHIADO, G.; ADAM, M. L.; SILVA, C. D.; SOLEY, B. S.; DE MELLO-SAMPAYO, C.; CABRINI, D. A.; CORRER, C. J.; OTUKI, M. F. Quantitative genotoxicity assays for analysis of medicinal plants: a systematic review. **Journal of Ethnopharmacology**. v.178, p.289-296, 2016.

TCHAMADEU, M. C.; DZEUFUET, P. D.; NANA, P.; NOUGA, C. K.; TSOFAK, F. N.; ALLARD, J.; BLAES, N.; SIAGAT, R.; ZAPFACK, L.; GIROLAMI, J. P.; TACK, I. Acute and sub-chronic oral toxicity studies of an aqueous stem bark extract of *Pterocarpus soyauxii* Taub (Papilionaceae) in rodents. **Journal of Ethnopharmacology**. v.133, n.2, p.329-335, 2011.

TRAUTENMULLER, A. L.; DE ALMEIDA SOARES, J.; GODOI, M. M.; DE PAULA, J. A.; AMARAL, V. C. Exposição pré-natal ao extrato seco de *Momordica charantia* L. em ratas Wistar: análise de parâmetros reprodutivos. **Anais do Congresso de Ensino, Pesquisa e Extensão da UEG** (ISSN 2447-8687), v.3, 2017.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.42, n.2, 2006.

VIEL, A. M. *Efeitos do extrato de Agave sisalana Perrine sobre a toxicidade ovariana e uterina, fertilidade e parâmetros fetais de ratas*. 2016. 54 f. Dissertação (Mestrado em Biociências) – Universidade Estadual Paulista, Assis, 2016.

VITRAL, G. S.; PETERS, V. M.; GUERRA, M. D. Mecanismos da ação embriotóxica do barbatimão (*Stryphnodendron polyphyllum* M.). **Reprodução**. v.3, p.222-226, 1987.

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

ZHANG, Q.; YE, X.; WANG, L.; PENG, B.; ZHANG, Y.; BAO, J.; LI, W.; WEI, J.; WANG, A.; JIN, H.; CHEN, S. Embryo-fetal development toxicity of honokiol microemulsion intravenously administered to pregnant rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**. v.29, n.74, p.117-122, 2016.

6. APÊNDICES

6.1. Artigo I: Aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos do pequi (*Caryocar brasiliense* Cambess.)

Submetido ao periódico “*Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*” (Fator de impacto 0.296, Qualis B3 na área Medicina II). Data de submissão: 05/09/2016.

Link com as normas da revista: <http://www.scielo.br/revistas/rbpm/pinstruc.htm>

**Aspectos químicos, farmacológicos e toxicológicos do pequi (*Caryocar
brasiliense* Cambess.)**

**Chemical, pharmacological and toxicological aspects of pequi (*Caryocar
brasiliense* Cambess.)**

TRAESEL, G.K.^{1*}; OESTERREICH, S.A.²

¹Laboratório de Ensaio Toxicológicos. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Grande Dourados. Rodovia Dourados - Itahum, Km 12. Caixa Postal - 533. CEP: 79.804-970. Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Telefone: + 55 67 3410-2332. E-mail: giselitraesel@gmail.com

²Laboratório de Ensaio Toxicológicos. Faculdade de Ciências da Saúde. Universidade Federal da Grande Dourados. Rodovia Dourados - Itahum, Km 12. Caixa Postal - 533. CEP: 79.804-970. Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. Telefone: + 55 67 3410-2332. E-mail: silviaoesterreich@gmail.com

*Autor para Correspondência.

Resumo: As plantas representam uma importante fonte de compostos biologicamente ativos. Estudos que buscam reunir informações sobre espécies vegetais consumidas pela população possuem grande importância científica e econômica. O presente trabalho objetivou realizar um levantamento bibliográfico de artigos originais, artigos de revisões, dissertações, teses e livros,

cujo objeto de estudo fosse o *Caryocar brasiliense*. A pesquisa contemplou informações botânicas, geográficas, usos populares e de composição centesimal e química da espécie. Além, ainda, dos principais estudos sobre efeitos biológicos e toxicológicos. Os estudos presentes na literatura apontaram que a espécie é amplamente difundida e consumida pela população. Seu fruto é rico em ácido oleico, carotenoides e diversos compostos fenólicos, com destaque para o ácido gálico. Entre os efeitos farmacológicos encontrados, destaca-se o potencial antimutagênico, bactericida, fungicida, neuroprotetor, vasorrelaxante, cicatrizante e quimiopreventivo. Seus estudos toxicológicos são incipientes e representam um gargalo de pesquisa. Embora amplamente consumida pela população e com algumas pesquisas de efeito biológico atuais, há ainda grande carência de estudos que comprovem a atividade biológica indicada pelo uso popular, bem como testes que apontem segurança para uso, o que representa campo propício para novos estudos.

Palavras-chave: pequi, piqui, plantas medicinais, atividades farmacológicas, Bioma Cerrado.

Abstract: The plants are a significant source of biologically active compounds. Studies seeking to gather information on plant species consumed by the population have a great scientific and economic importance. This study aimed to perform a literature review of original articles, review articles, dissertations, theses and books in English and Portuguese, whose object of study was the *Caryocar brasiliense*. The research included popular applications, chemical composition, botanical and geographical information of the species. In addition, further major studies on biological and toxicological effects. Studies in the literature indicated that the species is widespread and consumed by the population. Its fruit is rich in oleic acid, carotenoids and various phenolic compounds, especially gallic acid. Among the pharmacological effects found, there is the potential antimutagenic, bactericide, fungicide, neuroprotective, vasorelaxant,

healing and chemopreventive. Its toxicological studies are incipient and represent a research bottleneck. Although widely consumed by the population and with some current biological effect of research, there is still a great lack of studies confirming the biological activity highlighted by the popular use, as well as tests that point safety for use, which is conducive ground for new studies.

Key-words: pequi, piqui, medicinal plants, pharmacological activities, Cerrado Biome.

Introdução

As plantas representam uma importante fonte de compostos biologicamente ativos. A utilização popular de plantas medicinais no tratamento de inúmeras doenças aponta para a necessidade de estudos químicos, experimentais e clínicos, que objetivem validar as propriedades etnoterapêuticas, bem como determinar a segurança de uso destas espécies (Grochank et al., 2016).

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

O Cerrado brasileiro é reconhecido como uma das 25 áreas mundiais prioritárias para bioconservação e como a savana tropical 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). Esta região possui flora nativa composta por 11.627 espécies vegetais catalogadas e 1.600 espécies de animais (Klink & Machado, 2005). Estima-se que mais de 220 espécies nativas do Cerrado são utilizadas com fins medicinais (Oliveira et al., 2011).

Caryocar brasiliense Cambess é uma espécie natural do Brasil, popularmente conhecida como pequi ou piqui. A espécie está distribuída nos estados de Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais, São Paulo, Paraná, Pará e alguns estados nordestinos. Trata-se de uma árvore que apresenta diversas formas de utilização (*tópico Aplicações populares*). A madeira é empregada na fabricação de móveis e na construção civil (CEPA, 1984). A casca é utilizada com fins de tinturaria (Almeida & Silva, 1994). As folhas são usadas na medicina popular e na alimentação de animais (Kerr et al., 2007). A amêndoa é empregada na culinária (Melo Junior et al., 2004). O fruto é utilizado na culinária, medicina popular e para extração de óleo (Kerr et al., 2007). O óleo extraído é empregado com finalidades medicinais, cosméticas e de saboaria (Almeida & Silva, 1994; Oliveira, 1998).

Visualizando toda a utilização popular do pequi, percebe-se sua importância nutricional, medicinal, social e econômica. Em virtude disso, alguns estudos científicos vêm sendo realizados buscando correlacionar a sua composição química (*tópicos Composição Centesimal e Composição Química*) com seus efeitos biológicos (*tópico Efeitos Biológicos*). Embora a planta seja muito conhecida e consumida, existe um gargalo de pesquisa, principalmente no que concerne aos testes toxicológicos (*tópico Potencial Toxicológico*). Neste sentido, o presente trabalho teve por objetivo realizar uma revisão de estudos científicos sobre essa planta, buscando subsidiar e estimular novas pesquisas, sobretudo com os frutos do Cerrado brasileiro.

Fonte de Dados

Para a escrita desse trabalho realizou-se levantamento bibliográfico de artigos originais, artigos de revisão, dissertações, teses e livros disponíveis *online*. Usou-se como período os anos de 1968 a 2016 e como idioma as línguas portuguesa e inglesa. As palavras-chave utilizadas como fonte de pesquisa foram: Pequi, Piqui, *Caryocar brasiliense*, Toxicidade e

Toxicity. Os trabalhos acadêmicos utilizados para elaboração desta pesquisa foram extraídos das bases de dados: *PubMed*, *Scielo*, Portal Periódicos da CAPES e *Scholar Google*.

Considerações Botânicas

Caryocar brasiliense Cambess é popularmente conhecido como “pequi”, “piquei”, “piqueiá”, “piqueiá-bravo”, “pequeiá-pedra”, “pequerim”, “suari”, “piquei-vinagreiro”, “pequi-do-cerrado”, “amêndoa de espinho”, “grão de cavalo” e “amêndoa do Brasil”. A localização geográfica interfere nos nomes populares, sendo que no Cerrado a espécie é principalmente conhecida como “pequi” (Lima et al., 2007). Etimologicamente, a denominação “pequi” origina-se da palavra tupi “pyqui”, que significa casca espinhosa (py = casca e qui = espinho). Possivelmente, devido aos pequenos espinhos presentes no endocarpo do fruto (Almeida & Silva, 1994).

Em termos taxonômicos, o *C. brasiliense* é pertencente à família Caryocaraceae, da ordem Theales (Rizobolácea). Seu gênero, *Caryocar*, abrange aproximadamente vinte espécies (Lorenzi, 1992).

O pequizeiro é uma espécie arbórea que pode atingir até 15 m de altura. A árvore pode ser classificada como frutífera ou oleaginosa (Almeida et al., 1998). O tronco apresenta uma média de 2 a 3 m de circunferência, com casca escura. A copa da árvore é ampla, apresentando galhos compridos, vultosos e levemente inclinados. A madeira apresenta-se de coloração amarelo pardo. As folhas são verdes e brilhantes, com laterais serreadas, denteadas ou crenadas (Almeida & Silva, 1994).

A frutificação ocorre principalmente entre os meses de janeiro a março, sendo possível encontrar frutos mesmo fora dessa época. Períodos prolongados de chuvas causam irregularidades na frutificação. Períodos secos favorecem a frutificação (Ribeiro, 2000). A floração ocorre após a emissão das folhas novas e os frutos alcançam maturidade entre três e quatro

meses após a floração. A colheita dos frutos deve feita no chão, logo após a queda natural, obtendo, assim, frutos de maior valor nutricional (Oliveira et al., 2006).

Os frutos são drupoides e globosos. Externamente, o fruto é recoberto pelo pericarpo (casca). A coloração do pericarpo varia de verde-amarelada (Almeida & Silva, 1994) até marrom-esverdeada (Melo Junior et al., 2004). Logo após o pericarpo, inicia-se o mesocarpo externo (polpa branca) e então o mesocarpo interno (polpa comestível). O mesocarpo interno apresenta-se com coloração amarelada, de aspecto carnosos e com aroma característico. Após o mesocarpo interno, o fruto apresenta o endocarpo (envoltório das amêndoas), sendo este rígido e espinhoso. Por fim, na parte mais interna do fruto, há a presença das amêndoas. Estas são recobertas por um fino tegumento, são oleaginosas, comestíveis e em número de uma a quatro por fruto (Almeida & Silva, 1994, Melo Junior et al., 2004).

Cada árvore pode fornecer de 500 a 2.000 frutos por safra. Estes frutos apresentam média de 100 a 300 g de peso e 6 a 10 cm de diâmetro (Almeida & Silva, 1994).

Distribuição Geográfica

O Brasil é o centro de dispersão do gênero *Caryocar*, o que possibilita que ocorram espécies em todas as regiões do país (Almeida et al., 1998). Em virtude dessa característica, alguns autores consideram o pequizeiro como árvore símbolo do Cerrado.

A espécie *C. brasiliense* está distribuída nos estados de Mato Grosso, Goiás, Distrito Federal, São Paulo, Minas Gerais, São Paulo, Paraná e alguns estados nordestinos, sendo amplamente consumida pela população desses estados (Kerr et al., 2007). Dentro do contexto nacional, o estado de Minas Gerais é responsável pela maior produção e consumo do pequi. Somente no ano de 2004, foram comercializados neste estado cerca de 20.000 kg do fruto (Lima, 2006).

A estimativa de concentração de árvores é de 40 unidades por hectare. A espécie se adapta de ambientes tropicais até subtropicais. Em termos de solo, a espécie é considerada rústica e pouco exigente (Oliveira, 1998), o que facilita sua dispersão geográfica.

Aplicações populares

O pequi trata-se de uma espécie que apresenta diversas formas de utilização. Além da significativa importância alimentar, também constitui fonte de renda para moradores de regiões aonde a planta é produzida. Apresenta, dessa forma, importantes características econômicas e sociais (Ribeiro, 2000).

A árvore é considerada ornamental devido ao seu porte e à beleza das flores (Kerr et al., 2007). A madeira obtida da árvore é de boa qualidade, durável e apresenta grande resistência. É empregada na fabricação de móveis, caibros, postes e lenhas (CEPA, 1984). Também é própria para xilografia, construção civil e na fabricação de carvão, dado seu elevado teor de carbono e poder calorífico (Almeida & Silva, 1994; Kerr et al., 2007).

A casca, após maceração, libera pigmento utilizado em tingimentos artesanais. Além disso, é também empregada na alimentação de bovinos e na indústria do curtume (Almeida & Silva, 1994). As folhas são utilizadas como reguladoras menstruais (Almeida & Silva, 1994) e na alimentação de animais (Kerr et al., 2007). A amêndoa é utilizada na preparação de doces, paçocas, geléias, além de ser consumida *in natura*, como petisco (Melo Junior et al., 2004).

O fruto é a parte mais explorada da árvore. Dele se extrai a polpa, que é amplamente consumida pela população. A polpa do pequi é altamente calórica, apresenta potencial fortificante, é estimuladora de apetite e atua como fonte nutricional de vitaminas e lipídeos (Guimarães, 2003).

Na culinária, a polpa é utilizada na elaboração de diferentes pratos típicos: arroz com pequi, feijão com pequi, frango com pequi e o baião de três (arroz, feijão e pequi). Também é

comum ser batida com leite e usada para o preparo de licores e cachaças (Kerr et al., 2007). Relatos da população do Cerrado apontam o consumo da polpa como afrodisíaco para os homens e fortificante para mulheres gestantes (Kerr et al., 2007).

O óleo extraído da polpa apresenta diversas utilidades. De uma maneira geral, seus principais usos são reportados para a culinária local e na etnofarmacologia (Oliveira, 1998), apresentando alto valor energético e vantagem comparativa, em termos de produção, com outras oleaginosas (de Oliveira et al., 2008). Na culinária é muito empregado na cocção do arroz e como tempero de carnes e saladas. Na medicina popular é empregado como bálsamo em reumatismos (Pozo, 1997), como anti-inflamatório, cicatrizante, no tratamento de doenças respiratórias, úlceras gástricas, dores musculares e reumáticas (Bezerra et al., 2015). Na indústria, é empregado para finalidades cosméticas e de saboaria (Almeida & Silva, 1994; Oliveira, 1998).

A produção de biodiesel a partir do óleo do pequi também é uma potencialidade a ser discutida. Análises físico-químicas foram realizadas em biodiesel produzido a partir deste e os resultados encaixaram-se dentro das especificações da Agência Nacional do Petróleo (Batista et al., 2013).

Composição Centesimal

Os resultados obtidos da literatura apontaram que a polpa do fruto do pequi é rica em lipídeos (média de 30,39%) e fibras alimentares (média de 9,01%) (Tabela 1). O consumo de lipídeos insaturados de origem vegetal vem sendo apontado como estratégia terapêutica para o controle de hipercolesterolemia e eventos cardiovasculares (Santos et al., 2013). Já o consumo regular de fibra alimentar relaciona-se positivamente com a redução do risco de diversas patologias do trato digestivo, como o câncer de intestino grosso (Michel et al., 2005). Diante do exposto, afirma-se que a composição centesimal descrita para a polpa do pequi é

biologicamente importante, visto que lipídeos e fibras são componentes bioativos relacionados com prevenção de doenças.

Já a amêndoa apresentou uma média de 2,57% de cinzas – alta quando comparada com a média de cinzas da polpa, que foi de 1,32% (Tabela 1). As cinzas representam os minerais contidos nos alimentos e um valor aumentado representa, por consequência, a abundância de elementos minerais em determinada amostra (Almeida et al., 2003). Os minerais essenciais desempenham papel fundamental no organismo humano. Eles estão envolvidos em diversos processos metabólicos e reações bioquímicas, como, por exemplo, na contração muscular, no equilíbrio ácido base, na ativação de enzimas e na respiração celular (Król et al., 2012). A maior porcentagem de cinzas na amêndoa indica que os minerais se concentram nessa parte do fruto, apontando sua importância em termos de nutrição humana.

Composição Química

O *C. brasiliense*, devido sua importância alimentar e econômica, vem sendo alvo de muitas pesquisas nos últimos anos. Um dos principais focos dessas pesquisas é em relação ao isolamento e caracterização de constituintes químicos. Apresentamos, abaixo, dois quadros resumidos apontando os principais estudos em relação a constituintes químicos gerais (Tabela 2) e ácidos graxos (Tabela 3) reportados para o *C. brasiliense*.

Como é possível observar na Tabela 2, diversos autores quantificaram diferentes tipos e classes de compostos antioxidantes em várias partes do *C. brasiliense*. Os antioxidantes apresentam potencial de estabilizar ou desativar o excesso de radicais livres, antes que estes ataquem os alvos biológicos celulares e acarretem em doenças degenerativas (Gama & de Sylos, 2007). Muitos estudos clínicos e epidemiológicos vêm sendo realizados no intuito de mostrar a relação entre o consumo de antioxidantes naturais e a diminuição significativa de doenças crônicas e degenerativas (Rocha et al. 2015). Dessa forma, o uso de antioxidantes provenientes de

dieta vegetal vem sendo estimulada como uma estratégia terapêutica no combate de radicais livres e consequente prevenção de doenças degenerativas.

Em relação ao perfil de ácidos graxos do *C. brasiliense*, é possível notar que esse também tem sido amplamente estudado e apresenta-se com poucas variações entre as pesquisas. Percebe-se a predominância de ácidos graxos do tipo insaturado nas amostras analisadas, bem como a detecção do ácido oleico como componente majoritário em todos os estudos. Analisando os dados reportados na literatura, o ácido oleico apresentou-se com uma média de 54,49% para a polpa do pequi. A presença de elevadas quantidades de ácido oleico é um resultado muito promissor do ponto de vista biológico e funcional. Ele participa de diversas funções no metabolismo humano, desempenhando papel na síntese de hormônios, na prevenção de doenças cardíacas e na redução do LDL-colesterol (Navarro-Tito et al, 2010).

Efeitos Biológicos

Composto isolado das folhas do *C. brasiliense* apresentou propriedades antitumorais. Oliveira et al. (1968) isolaram seis compostos das folhas do pequi: friedelina, friedelanol, ácido oleanólico, β -sitosterol, estigmansterol e β -amirina. Os pesquisadores administraram os compostos a camundongos portadores do sarcoma 180 na forma sólida (um tipo de câncer de pele). O tratamento com o ácido oleanólico inibiu o desenvolvimento do tumor em até 67%, apontando potencial propriedade antitumoral.

Extrato etanólico das folhas e cascas do *C. brasiliense* apresentou atividade moluscicida. Pesquisadores apontaram que esses extratos (em 100 ppm) foram capazes de causar a morte de 90% de uma população de *Biomphalaria glabrata*. A importância se dá pelo fato desse molusco ser o hospedeiro intermediário *Schistosoma mansoni*, agente etiológico da esquistossomose. Os autores relacionam a atividade moluscicida à presença de taninos, flavonoides e terpenos presentes nos extratos (Bezerra et al., 2002).

Diferentes partes do *C. brasiliense* foram relatadas apresentando atividade antifúngica. Grupo de pesquisa determinou a atividade antifúngica do óleo essencial da amêndoa do pequi sobre *Cryptococcus neoformans* e *Paracoccidioides brasiliensi*. O mesmo grupo também determinou que o extrato etanólico obtido das folhas do *C. brasiliense* apresentou-se eficaz contra cepas de *C. neoformans* var. *neoformans*. 89,5% dos isolados foram inibidos em uma concentração menor ou igual a 1.000 µg/mL (Passos et al., 2002). Outra pesquisa, agora em 2011, apontou que os extratos aquosos e hidroetanólicos das folhas do *C. brasiliense* apresentaram atividade antifúngica sobre o *Colletotrichum gloeosporioides* e *Corynespora cassiicola* (Naruzama & Papa, 2011).

Pesquisas apontam que o *C. brasiliense* apresenta potencial para diminuir a viabilidade de diferentes micro-organismos patogênicos ao homem. O extrato obtido do endocarpo do fruto promoveu diminuição da viabilidade de formas taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. A ação do extrato se deu, principalmente, por indução de alterações morfológicas no citoesqueleto do protozoário (Santiago, 1998). Camundongos foram infectados com formas tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. O tratamento com o extrato etanólico da casca do *C. brasiliense* foi capaz de promover diminuição de parasitas no sangue dos camundongos infectados, apontando a atividade tripanocida do extrato (Herzog-Soares et al., 2002). Já o extrato hidroetanólico das folhas do pequi foi capaz de inibir a proliferação de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Esse resultado foi considerado promissor, visto que o efeito do extrato foi superior aos efeitos da droga de escolha para o tratamento da leishmaniose (Glucantime) (Paula-Junior et al., 2006).

A polpa do *C. brasiliense* apresenta atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*. Os extratos etéreo, alcoólico e aquoso da polpa e da amêndoa do *C. brasiliense* foram avaliados através dos testes: co-oxidação do β-caroteno/ácido linoleico, DPPH, ABTS, ORAC e Rancimat. Além disso, o extrato aquoso da polpa do pequi foi administrado a animais saudáveis e a atividade

antioxidante foi avaliada pela quantificação da CAT, SOD, GPx, GR no cérebro e fígado desses animais. Todos os testes apresentaram expressiva atividade antioxidante (de Lima, 2008). A atividade antioxidante do pequi também foi avaliada das folhas pelo método DPPH (Paula-Junior et al., 2006) e da polpa por peroxidação lipídica (Roesler et al., 2008), com resultados satisfatórios.

O extrato aquoso da polpa do *C. brasiliense* apresentou ação antimutagênica. Em 2008, duas pesquisas avaliaram a eficácia do extrato da polpa do fruto contra a mutagenicidade induzida pelos agentes ciclofosfamida e bleomicina em medula óssea de camundongos (Khouri et al., 2008) e ratos (Miranda-Vilela et al., 2008). Os resultados de ambos os trabalhos apontam para o potencial antimutagênico do extrato, que protegeu o DNA dos animais pesquisados contra a ação genotóxica das drogas. Os autores relacionaram os resultados às propriedades antioxidantes do fruto.

Quando administrado a atletas, o óleo da polpa do *C. brasiliense* reduziu lesão dos tecidos, diminuiu marcadores de lesão hepática, diminuiu o colesterol total e colesterol LDL, aumentou o colesterol HDL, diminuiu os valores de pressão arterial e mostrou atividade anti-inflamatória (Miranda-Vilela et al., 2009a; 2009b).

Extrato etanólico da casca do *C. brasiliense* apresentou ação neuroprotetora. Ratos Wistar foram submetidos à isquemia global transitória e reperfusão cerebral. A administração do *C. brasiliense* nestes animais reduziu o número de neurônios isquêmicos, principalmente na região do córtex frontal, apontando para uma possível ação neuroprotetora do extrato (Miguel et al., 2011).

O óleo extraído da polpa do *C. brasiliense* apresentou atividade antibacteriana. Os autores realizaram o ensaio antibacteriano utilizando a técnica de difusão em meio sólido e o óleo do *C. brasiliense* mostrou-se eficaz contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* ATTC27853 (Ferreira et al. 2011).

O extrato hidroalcoólico e a fração butanólica obtidos de folhas do *C. brasiliense* apresentaram efeito vasorrelaxante. O experimento foi realizado em aortas de ratos Wistar e os resultados apontaram que o tratamento com o *C. brasiliense* produziu relaxamento do endotélio aórtico. Assim, os autores afirmam a importância de mais estudos para elucidar o uso potencial do *C. brasiliense* em condições patológicas como hipertensão e aterosclerose (de Oliveira et al., 2012).

O óleo do *C. brasiliense* promoveu proteção contra danos oxidativos. Os danos foram estabelecidos em camundongos através da administração de uretano. A suplementação prévia com o óleo foi capaz de reduzir o estresse oxidativo e danos genéticos induzidos pelo uretano. Estes resultados sugerem que a ingestão de pequi pode proteger contra a genotoxicidade e estresse oxidativo (Colombo et al., 2015).

O óleo do *C. brasiliense* promoveu aceleração de reparo tecidual. Ratos Wistar foram submetidos à ferida cutânea e posteriormente foram tratados com aplicação tópica do óleo do *C. brasiliense*. O óleo promoveu diminuição de células inflamatórias e aumento de fibroblastos no local da ferida. Os autores afirmam que o óleo foi capaz de acelerar o reparo tecidual, apresentando efeitos cicatrizantes (Bezerra et al., 2015).

O óleo do *C. brasiliense* apresentou efeito quimiopreventivo. Camundongos foram submetidos à indução de lesões pré-neoplásicas hepáticas pela administração de dietilnitrosamina cancerígena. A administração do óleo do *C. brasiliense* reduziu o desenvolvimento das lesões pré-neoplásicas. Os autores afirmam que o óleo tem potencial para ser utilizado na prevenção de câncer hepático (Palmeira et al., 2015).

Potencial Toxicológico

Mesmo com todos os apontamentos de efeitos terapêuticos do *C. brasiliense* e da ampla utilização do fruto na alimentação humana e animal, localizamos apenas oito pesquisas que avaliaram a toxicidade dessa espécie vegetal (Tabela 4).

A busca na literatura apontou que as folhas (n=4 estudos) e cascas (n=3 estudos) foram as partes mais estudadas da espécie quanto aos efeitos tóxicos. A polpa, que é justamente a parte mais consumida do pequi, foi pesquisada somente em dois estudos. Um que apontou que seu extrato é genotóxico para *Drosophila melanogaster* e outro que apontou seu óleo como tóxico para *Artemia salina*. Embora esses modelos experimentais sejam confiáveis, eles funcionam como um *screening* inicial para determinar a toxicidade de substâncias. São necessários, portanto, estudos que provem os efeitos da polpa e seu óleo sobre mamíferos, através, por exemplo, de testes de toxicidade aguda, subcrônica e teratogênese.

Apesar de não terem sido verificados registros na literatura sobre a intoxicação de animais e seres humanos com *C. brasiliense*, estudos para determinar a toxicidade são imprescindíveis (Farsi et al., 2013), ainda mais quando se considera suas potencialidades farmacêuticas e alimentares.

Conclusão

A partir da revisão bibliográfica do *Caryocar brasiliense* pode-se concluir que essa espécie apresenta grande valor do ponto de vista nutricional, medicinal, social e econômico. Embora amplamente consumida pela população e com algumas pesquisas de efeito biológico atuais, há ainda grande carência de estudos que comprovem a atividade biológica apontada pelo uso popular, bem como testes que apontem segurança para uso. Nesse sentido, evidencia-se um gargalo, apontando para a necessidade de aprofundamento científico sobre o uso da espécie, principalmente em termos de efeitos farmacológicos e toxicológicos.

Referências Bibliográficas

ALMEIDA, A. C. et al. Toxicidade aguda dos extratos hidroalcoólicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira e barbatimão e do farelo da casca de pequi administrados por via intraperitoneal. **Revista Ciência Rural**, v.39, 2009.

- ALMEIDA, M.M.B. et al. Determinação de umidade, fibras, lipídios, cinzas e sílica em plantas medicinais. **Boletim do Centro de Processamento de Alimentos**, v.21, n.2, p.343-350, 2003.
- ALMEIDA, S.P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. 464p.
- ALMEIDA, S.P.; SILVA, J.A. **Piqui e Buriti: importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1994. 38p.
- AMARAL, L.F. et al. Evaluation of the cytotoxicity and phototoxicity of Caryocar brasiliense supercritical carbon dioxide extract. **BMC complementary and alternative medicine**, v.14, n.1, p.1, 2014.
- AZEVEDO-MELEIRO, C.H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v.17, p.385-396, 2004.
- BARRA, P.M. et al. Simultaneous analysis of saturated and unsaturated fatty acids present in pequi fruits by capillary electrophoresis. **Química Nova**, v.36, n.9, p.1430-1433. 2013.
- BATISTA, A. et al. Caracterização físico-química do biodiesel de pequi (Caryocar brasiliensis). **Revista Brasileira de Engenharia de Biosistemas**, v.7, p.23-26, 2013.
- BEZERRA, J.C.B. et al, Molluscicidal activity against *Biomphalaria glabrata* of Brazilian Cerrado medicinal plants. **Fitoterapia**, v.73, n.5, p.428-430, 2002.
- BEZERRA, N. et al. A ação do óleo de pequi (Caryocar brasiliense) no processo cicatricial de lesões cutâneas em ratos. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, v.17, n.4, 2015.
- BRASIL. Produção de Combustíveis Líquidos a partir de Óleos Vegetais. Ministério da Indústria e do Comércio - Secretaria de Tecnologia e Indústria, Brasília. 1985.
- CARDOSO, L.D.M. **Araticum, cagaita, jatobá, mangaba e pequi do Cerrado de Minas Gerais: ocorrência e conteúdo de carotenóides e vitaminas**. 2011. 78p. Dissertação (Mestrado em Ciência da Nutrição), Universidade Federal de Viçosa, Viçosa.
- CASTRO, A.J.S. et al. Recombinogenic effects of the aqueous extract of pulp from pequi fruit (Caryocar brasiliense) on somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular Research**, v.7, p. 375-383, 2008.
- COLOMBO, N.B.R. et al. Caryocar brasiliense camb protects against genomic and oxidative damage in urethane-induced lung carcinogenesis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.48, n.9, p.852-862, 2015.
- COMISSÃO ESTADUAL DE PLANEJAMENTO AGRÍCOLA. Experimentos integrados para desenvolvimento da cultura do pequi e seu aproveitamento industrial: relatório de pesquisa. Teresina, 17p. 1984.

- CORDEIRO, M.W.S. et al. Características físicas, composição químico-nutricional e dos óleos essenciais da polpa de Caryocar brasiliense nativo do estado de Mato Grosso. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.35, n.1, 2013.
- DE LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante in vitro e in vivo, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (Caryocar brasiliense, Camb.)**. 2008. 219p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- DE MELO, J.G. et al. Medicinal Plants Used as Antitumor Agents in Brazil: An Ethnobotanical Approach. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, 2011.
- DE OLIVEIRA, M.E.B. et al. **Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi**. Embrapa Agroindústria Tropical. 2008.
- ELIAS, F. et al. Toxicological studies on the Eugenia dysenterica DC and Caryocar brasiliense Cambess leaves in rats. **Planta Medica**, v.76, n.12, p.643, 2010.
- FACIOLI N.L.; GONCALVES, L.A.G. Piqui (Caryocar brasiliense Camb) oil triglyceride composition modification by enzymatic way. **Química Nova**, v.21, p.16-19, 1998.
- FARIA-MACHADO, A.F. et al. Discrimination of pulp oil and kernel oil from Pequi (Caryocar brasiliense) by fatty acid methyl esters fingerprinting, using GC-FID and multivariate analysis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.63, n.45, 2015.
- FARSI, E. et al. Genotoxicity and acute and subchronic toxicity studies of a standardized methanolic extract of Ficus deltoidea leaves. **Clinics**, v.68, p.865-875, 2013.
- FERREIRA, B.S., et al. Comparative properties of Amazonian oils obtained by different extraction methods. **Molecules**, v.16, n.7, p.5875-5885, 2011.
- FONSECA, L.D. et al. Efeitos de extratos aquosos de Caryocar brasiliense em camundongos. **Acta Scientiae Veterinariae**, v.44, p.1-6, 2016.
- GAMA, J.J.T.; SYLOS, C.M. Effect of thermal pasteurization and concentration on carotenoid composition of Brazilian Valencia orange juice. **Food Chemistry**, v.100, n.4, p.1686-1690, 2007.
- GODOY, H.T.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B. Occurrence of cis isomers of provitamin A in Brazilian fruits. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.42, p.1306-1313, 1994.
- GROCHANKE, B. et al. Compostos fenólicos da casca de Handroanthus heptaphyllus (Mart.) Mattos e efeitos do extrato aquoso no perfil lipídico, glicêmico e na lipoperoxidação em ratos diabéticos. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.18, p.264-272, 2016.
- GUIMARÃES, M. **Guia de Alimentação Infantil**. São Paulo: Ground, 2003.

- HERZOG-SOARES, J.D. et al. Atividade tripanocida in vivo de *Stryphnodendron adstringens* (barbatimão verdadeiro) e *Caryocar brasiliensis* (pequi). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.12, p.01-02, 2002.
- HIANE, P.A. et al. Composição centesimal e perfil de ácidos graxos de alguns frutos nativos do Estado de Mato Grosso do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.10, n.1, 1992.
- KERR, W.E. et al. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): informações preliminares sobre um pequi sem espinhos no caroço. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.1, 2007.
- KHOURI, J. et al. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, v.30, p.442-448, 2007.
- KLINK, C.A.; MACHADO, R.B. Conservation of the Brazilian Cerrado. **Conservation Biology**, v.19, n.3, p.707-713, 2005.
- KRÓL, J. et al. Content of selected essential and potentially toxic trace elements in milk of cows maintained in eastern Poland. **Journal of Elementology**, v.17, p.597–608, 2012.
- LIMA, A. Ouro do Cerrado: processamento agroindustrial da polpa do pequi garante renda a agricultores na entressafra. **Revista Minas faz Ciência**, v. 27, p.38-41, 2006.
- LIMA, A.D. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.29, n.3, p.695-698, 2007.
- LORENZI, H. **Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil**. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992.
- MELO-JUNIOR, A.F. et al. Estrutura genética de populações naturais de pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Scientia Forestalis**, n.66, p.56-65, 2004.
- MICHELS, K.B. et al. Fiber intake and incidence of colorectal cancer among 76,947 women and 47,279 men. **Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention**, v.14, 2005.
- MIGUEL, M.P. et al. Avaliação da ação neuroprotetora do extrato etanólico da casca de pequi em ratos submetidos à isquemia e reperfusão. XV Encontro Nacional de Patologia Veterinária e I Congresso Brasileiro de Patologia Veterinária, Goiânia, 2011.
- MIMURA, A. et al. Determination of Cu, Fe, Mn, Zn and free fatty acids in pequi oil. **Química Nova**, v.39, n.5, p.621-626, 2016.
- MIRANDA-VILELA, A.L. et al. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v.31, n.4, p.956-963, 2008.

- MIRANDA-VILELA, A.L. et al. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant-Val9Ala. **Genetics and Molecular Research**, v. 8, n.4, 2009a.
- MIRANDA-VILELA, A.L. et al. Pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp oil reduces exercise-induced inflammatory markers and blood pressure of male and female runners male and female runners. **Nutrition Research**, v.28, p.850-858, 2009b.
- MIRANDA-VILELA, A.L. et al. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by NMR spectroscopy. **Química Nova**, v.32, n.9, 2009c.
- NARUZAWA, E.S.; PAPA, M.F.S. Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.13, n.4, p.408-412, 2011.
- NAVARRO-TITO, N. et al. Oleic acid promotes migration on MDA-MB-231 breast cancer cells through an arachidonic acid-dependent pathway. **Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v.42, p.306-310, 2010.
- OLIVEIRA, A. et al. 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. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, p.283-289, 2011.
- OLIVEIRA, K. **Variabilidade genética entre e dentro de populações de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) do Estado de Goiás**. 1998. 105p. Dissertação (Mestrado em Agronomia), Universidade Federal de Goiás, Goiânia.
- OLIVEIRA, L.M.D. et al. Endothelium-dependent vasorelaxant effect of butanolic fraction from *Caryocar brasiliense* Camb. leaves in rat thoracic aorta. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.
- OLIVEIRA, M.D. et al. Triterpenes in *Caryocar brasiliense*. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v.40, n.4, p.451-452, 1968.
- OLIVEIRA, M.D. et al. Estádio de maturação dos frutos e fatores relacionados aos aspectos nutritivos e de textura da polpa de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v.28, p.380-386, 2006.
- PALMEIRA, S.M. et al. Chemopreventive effects of pequi oil (*Caryocar brasiliense* Camb.) on preneoplastic lesions in a mouse model of hepatocarcinogenesis. **European Journal of Cancer Prevention**, v.25, n.4, p.299-305, 2016.
- PASSOS, X.S. et al. Antifungal activity of *Caryocar brasiliensis* (*Caryocaraceae*) against *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.35, n.6, p.623-627, 2002.

- PAULA-JUNIOR, W. et al. Atividades leishmanicida, bactericida e antioxidante do extrato hidroetanólico das folhas de *Caryocar brasiliense* Cambess. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.16, 2006.
- POZO, O.V.C. **O pequi (*Caryocar brasiliense*): uma alternativa para o desenvolvimento sustentável do Cerrado no norte de Minas Gerais**. 1997. 100p. Dissertação (Mestrado em Administração Rural), Universidade Federal de Lavras, Lavras.
- RAMOS, M.I.L. **Desidratação do piqui (*Caryocar brasiliense*, Camb.): avaliação do processo através dos teores de carotenóides totais**. 1987. 120p. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos), Universidade de São Paulo, São Paulo.
- RAMOS, M.I.L. et al. Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides pró-vitamínicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb.). **Boletim do CEPPA**, v.19, n.1, p.23-32, 2001.
- RAMOS, M.I.L. et al. Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.28, p.90-94, 2008.
- RIBEIRO, D.M. **Propriedades físicas, químicas e bioquímicas de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) de diferentes regiões do Cerrado**. 2012. 64p. Dissertação (Mestrado em Nutrição Humana), Universidade de Brasília, Brasília.
- RIBEIRO, R.F. **Pequi: o rei do cerrado**. Belo Horizonte: Rede Cerrado, 2000.
- ROCHA, L. et al. Gallic acid as the major antioxidant in pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) fruit peel. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v.17, n.4, p.592-598, 2015.
- RODRIGUES, L.J. et al. Caracterização físico-química da amêndoa e polpa do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb) produzidos nas regiões Norte e Sul de Minas Gerais. **Congresso Brasileiro de Fruticultura**, Florianópolis, 2004.
- ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Food Science and Technology**, v.27, p.53-60, 2007.
- ROESLER, R. et al. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterization of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.110, n.3, p.711-717, 2008.
- ROESLER, R. et al. Brazilian cerrado antioxidant sources: cytotoxicity and phototoxicity in vitro. **Food Science and Technology**, v.30, n.3, p.814-821, 2010.
- SANO, S.M.; ALMEIDA, S.P. **Cerrado: ambiente e flora**. Planatina: EMBRAPA-CPAC, 1994.
- SANTIAGO, F.M. **Estudo das propriedades lectínicas, tóxicas e hemolíticas do fruto de *Caryocar brasiliensis***. 1998. 72p. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas), Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia.

SANTOS, R.D. et al. Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v.100, n.1, p.1-40, 2013.

SEGALL, S.D. et al. Triacylglycerol analysis of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil by electrospray and tandem mass spectrometry. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.86, p.445-452, 2006.

TROMBETA, D.C. et al. Avaliação da toxicidade aguda oral do extrato hidroalcoólico das folhas de pequi (*Caryocar brasiliense*) em camundongos, **Veterinária em Foco**, 2015.

Tabela 1. Composição centesimal da polpa e amêndoa do *C. brasiliense*.

	Hiane et al. (1992)		Rodrigues et al. (2004)		Lima et al. (2007)		Ribeiro (2011)	Cardoso (2011)	Cordeiro et al. (2013)
	Polpa	Amêndoa	Polpa	Amêndoa	Polpa	Amêndoa	Polpa	Polpa	Polpa
Umidade (%)	48,7	37,93	49,2	59,1	41,50	8,68	53,20	51,70	46,80
Cinzas (g)	0,63	3,20	0,4	0,5	0,63	4,01	0,62	0,45	0,57
Proteínas (g)	2,36	21,25	4,2	2,2	3,00	25,27	2,58	2,24	1,77
Lípídeos (g)	32,55	33,04	20,5	25,1	33,40	51,51	32,57	33,07	30,30
Carboidratos (g)	8,32	2,87	18,9	8,2	11,45	8,33	3,60	2,67	4,81
Fibra (g)	5,89	0,64	6,8	4,9	10,02	2,20	7,43	9,89	14,06

Tabela 2. Constituintes químicos identificados em diferentes partes do *C. brasiliense*.

Referência	Parte Usada	Constituintes identificados
Oliveira et al. (1968)	Folhas (extrato etanólico)	Friedelina, friedelanol, ácido oleoico, β -sitosterol, estigmasterol, β -amirilina e ácido elágico.
Ramos (1987)	Polpa (<i>in natura</i>)	Carotenoides totais (286,65 μ g/g).
Godoy & Amaya (1994)	Polpa (<i>in natura</i>)	Carotenoides totais (7,46 mg/100g).
Sano & Almeida (1994)	Polpa e Amêndoa (<i>in natura</i>)	Vitamina A, tiamina, riboflavina, vitamina C e niacina.
Ramos et al. (2001)	Polpa (crua e cozida)	β -caroteno, ζ -caroteno, criptoflavina, β -criptoxantina, anteraxantina, zeaxantina e mutatoxantina.
Bezerra et al. (2002)	Folhas e Cascas (extrato etanólico)	Taninos condensados, taninos hidrossolúveis e flavonóides. Nas folhas também foram identificados terpenos.
Azevedo-Meleiro & Rodriguez-Amaya (2004)	Polpa (<i>in natura</i>)	Violaxantina, luteína, zeaxantina, β -criptoxantina, β -caroteno e neoxantina.
Oliveira et al. (2006)	Polpa (<i>in natura</i> e congelada)	β -caroteno, licopeno e vitamina A.
Lima et al. (2007)	Polpa (<i>in natura</i>)	Fenólicos totais (209 mg/100g) e carotenoides totais (7,25 mg/100g).
de Lima (2008)	Polpa e Amêndoa (extrato etéreo, alcoólico e aquoso)	Ácido elágico, ácido gálico, 4-OH benzóico e p-cumárico.

Ramos et al. (2008)	Polpa (<i>in natura</i>)	1-zeaxantina, 4-translicopeno, 5- α -criptoxantina, zeinoxantina, 6-cis-licopeno, 7 e 8- γ -caroteno, 9-trans β -caroteno e 10-13-cis- β -caroteno.
Roesler et al. (2008)	Polpa (extrato etanólico)	Ácido gálico, ácido quínico, quercetina e quercetina 3-O-arabinose.
Ferreira et al. (2011)	Polpa (óleo artesanal)	Carotenoides totais (274,9 μ g/g) e fenólicos totais (229,1 g/g).
Cardoso (2011)	Polpa (<i>in natura</i>)	β -caroteno, β -criptoxantina, ácido ascórbico, α -tocoferol, α -tocotrienol, γ -tocoferol, γ -tocotrienol.
Cordeiro et al. (2013)	Polpa (<i>in natura</i>)	Hexanoato de etila, (E)- β - ocimeno e octanoato de etila.
Rocha et al. (2015)	Casca (extrato hidroetanólico)	Ácido gálico.
Mimura et al. (2016)	Polpa (óleo comercial e artesanal)	Fe (1,99-10,3 mg/100 g), Zn (1,15-3,19), Mg (0,42-0,91), Cu (0,31-0,56) e ácido oleico (1,61-10,7 g/100 g).

Tabela 3. Composição percentual de ácidos graxos na polpa do *C. brasiliense*.

Referência	Ácidos Graxos Insaturados (%)	Ácido oleico (%)	Ácido palmítico (%)
Brasil (1985)	-	57,40	34,40
Facioli & Gonçalves (1998)	-	53,90	40,02
Segall et al. (2006)		48,71	44,28
Lima et al. (2007)	61,35	55,87	35,17
Miranda-Vilela et al. (2009c)	-	54,28	41,87
Ferreira et al. (2011)	-	65,50	34,50
Barra et al. (2013)	-	58,98	35,33
	46,55	44,85	40,71
	51,00	49,83	40,50
Cordeiro et al. (2013)	52,65	51,55	40,37
	47,70	46,46	36,83
Faria-Machado et al. (2015)	-	64,66	23,12

Tabela 4. Estudos toxicológicos em diferentes partes do *C. brasiliense*.

Referência	Parte Usada	Modelo Usado	Resultado	Observações dos Autores
Castro et al. (2008)	Polpa (extrato aquoso)	Teste SMART em <i>Drosophila melanogaster</i>	Aumento da frequência de pontos mutantes.	Consideraram o extrato como genotóxico para <i>Drosophila melanogaster</i> . Sugerem estudos com doses menores.
Almeida et al. (2009)	Casca (extrato hidroalcoólico)	Toxicidade aguda por via intraperitoneal em camundongos <i>Swiss</i>	DL ₅₀ de 0,31 mg.mL ⁻¹ .	Consideraram o extrato como altamente tóxico (pois está acima de 0,25 mg.mL ⁻¹). Sugerem novos estudos para elucidar se o efeito é específico para essa via de administração.
Elias et al. (2010)	Folhas (extrato do pó)	Toxicidade de 15 dias por via oral em ratos Wistar.	Redução no timo e degeneração de fígado.	Consideraram o extrato como apresentando alguma toxicidade. Sugerem novos experimentos para analisar o tratamento durante um período de tempo maior.
Roesler et al. (2010)	Casca (extrato etanólico)	Citotoxicidade (células BALB/C 3T3)	DL ₅₀ 2840,7 mg.kg ⁻¹ .	Ausência de citotoxicidade neste modelo experimental.
		Fototoxicidade (células BALB/C 3T3)	0%	Ausência de fototoxicidade neste modelo experimental.
Ferreira et al. (2011)	Polpa (óleo artesanal)	Ensaio de letalidade com <i>Artemia salina</i>	DL ₅₀ de 827,62 µg/mL.	Consideraram o óleo como tóxico (pois está abaixo de 1000 µg/mL). Sugerem novos estudos para elucidar se o efeito é específico para esse modelo experimental.

Amaral et al. (2014)	Folhas (extrato apolar)	Citotoxicidade (células BALB/C 3T3)	IC ₅₀ >50,0%.	Ausência de citotoxicidade neste modelo experimental.
		Fototoxicidade (células BALB/C 3T3)	PIF=0,18 e MPE=-0,062.	Ausência de fototoxicidade neste modelo experimental.
Trombeta et al. (2014)	Folhas (extrato hidroalcoólico)	Toxicidade aguda por via oral em camundongos <i>Swiss</i>	DL ₅₀ de 1000 mg/kg.	Consideraram o extrato como moderadamente tóxico. Sugerem novos estudos para elucidar se o efeito é específico para esse modelo experimental.
Fonseca et al. (2016)	Casca (extrato aquoso)	Toxicidade aguda por via intraperitoneal em camundongos <i>Swiss</i>	DL ₅₀ de 149,8 mg/kg.	Consideraram os dois extratos como muito tóxicos (pois se situam entre 50 a 500 mg/kg). Sugerem futuros estudos avaliando a toxicidade por outras vias e para outras espécies de animais.
	Folhas (extrato aquoso)		DL ₅₀ de 67,01 mg/kg.	

6. APÊNDICES

6.2. Artigo II: Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats

Publicado no periódico “*Food and Chemical Toxicology*” (Fator de impacto 3.778, Qualis A2 na área Medicina II). Data de publicação: 14/09/2016.

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/food-and-chemical-toxicology/0278-6915/guide-for-authors>

6. APÊNDICES

6.3. Artigo III: Safety assessment of the oil from pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): evaluation of the potential genotoxic and clastogenic effects

Publicado no periódico “*Journal of Medicinal Food*” (Fator de impacto 1.955, Qualis B1 na área Medicina II). Data de publicação: 30/05/2017.

Link com as normas da revista: <http://www.liebertpub.com/forauthors/journal-of-medicinal-food/38/>

6. APÊNDICES

6.4. Artigo IV: Evaluation of embryotoxic and teratogenic effects of the oil extracted from *Caryocar brasiliense* Cambess pulp in rats

Publicado no periódico “*Food and Chemical Toxicology*” (Fator de impacto 3.778, Qualis A2 na área Medicina II). Data de publicação: 12/10/2017.

Link com as normas da revista: <https://www.elsevier.com/journals/food-and-chemical-toxicology/0278-6915/guide-for-authors>

7. ANEXOS

7.1. Parecer de aprovação da Comissão 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, 1 de março de 2016.

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "**Efeitos do óleo do pequi (*Caryocar brasiliense*, camb.) sobre a toxicidade aguda, subaguda, reprodutiva e genotoxicidade de ratos wistar**", protocolo nº 17/2015, sob responsabilidade de Silvia Aparecida Oesterreich – que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 08 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 11 de dezembro de 2015.

<i>Vigência do Projeto</i>	10/04/2016 – 10/04/2018
<i>Espécie/linhagem</i>	<i>Rattus norvegicus</i> /Wistar
<i>Nº de animais</i>	260
<i>Peso/idade</i>	200-300 g/ 50 dias
<i>Sexo</i>	95 Machos e 165 Fêmeas
<i>Origem</i>	Biotério da Faculdade de Ciências da Saúde-FCS/UFGD

Melissa Negrão Sepulveda

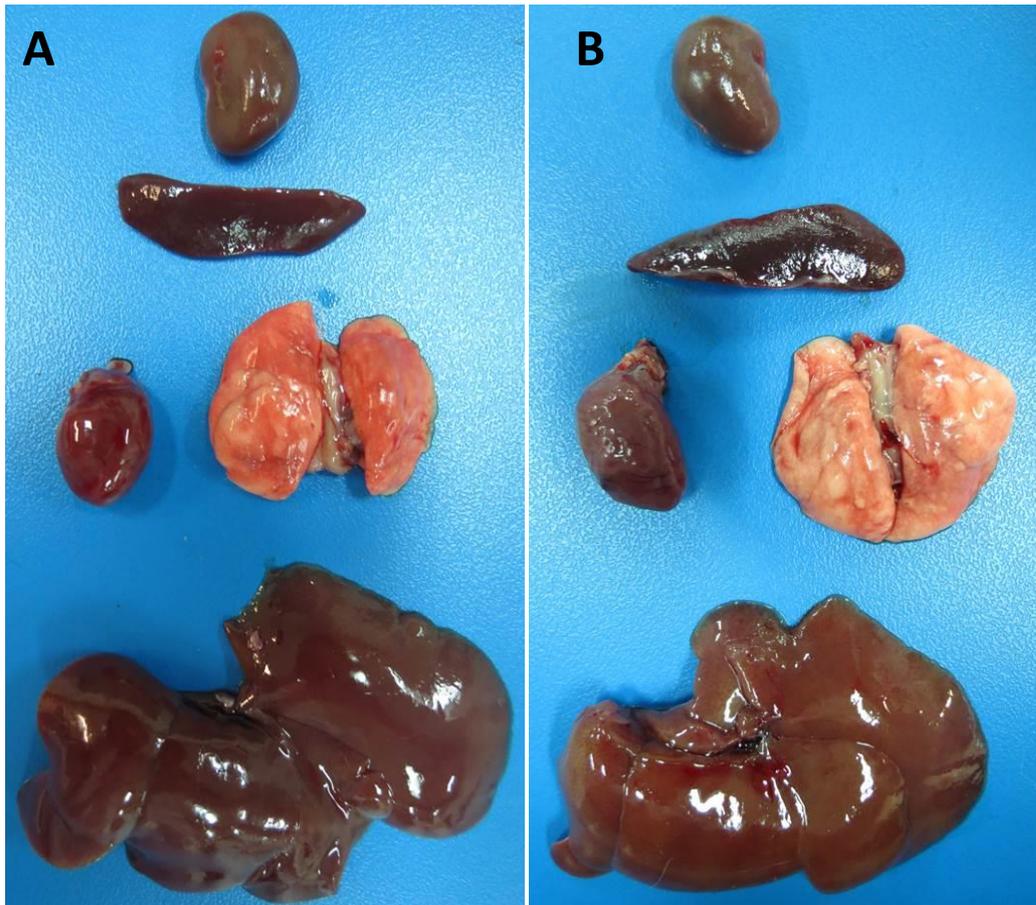
Melissa Negrão Sepulveda
Coordenadora CEUA

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UFGD – Rua João Rosa Góes, 1761 – Vila Progresso.
Dourados/MS. E-mail: ceua@ufgd.edu.br

7. ANEXOS

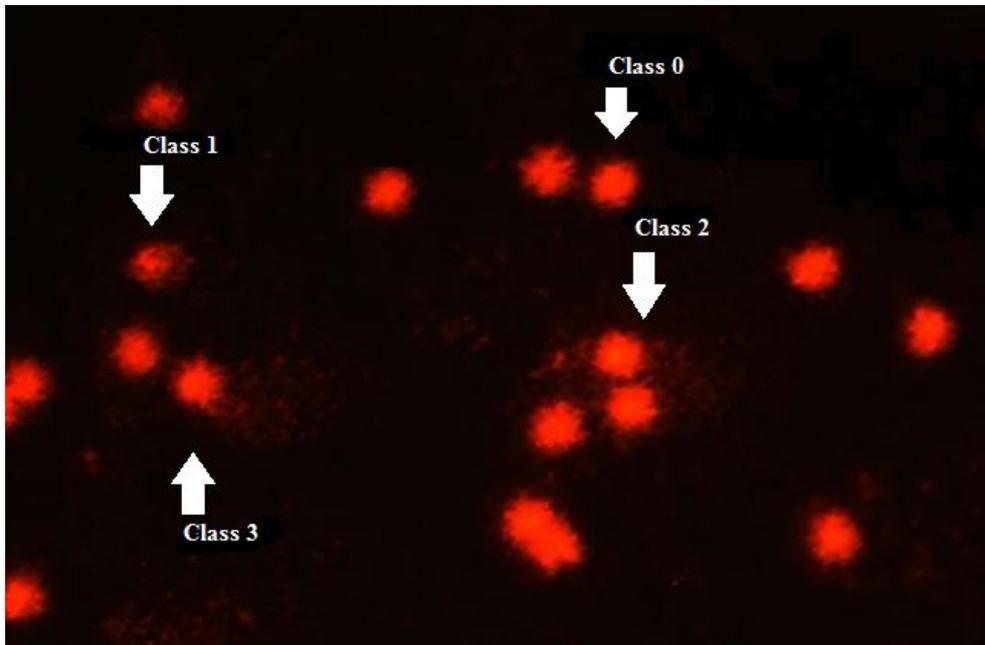
7.2. Dados Complementares

Figura 1. Análise macroscópica de órgãos (rim, baço, pulmão, coração e fígado) de animais tratados com solução salina (A) e com o óleo do pequi (B).



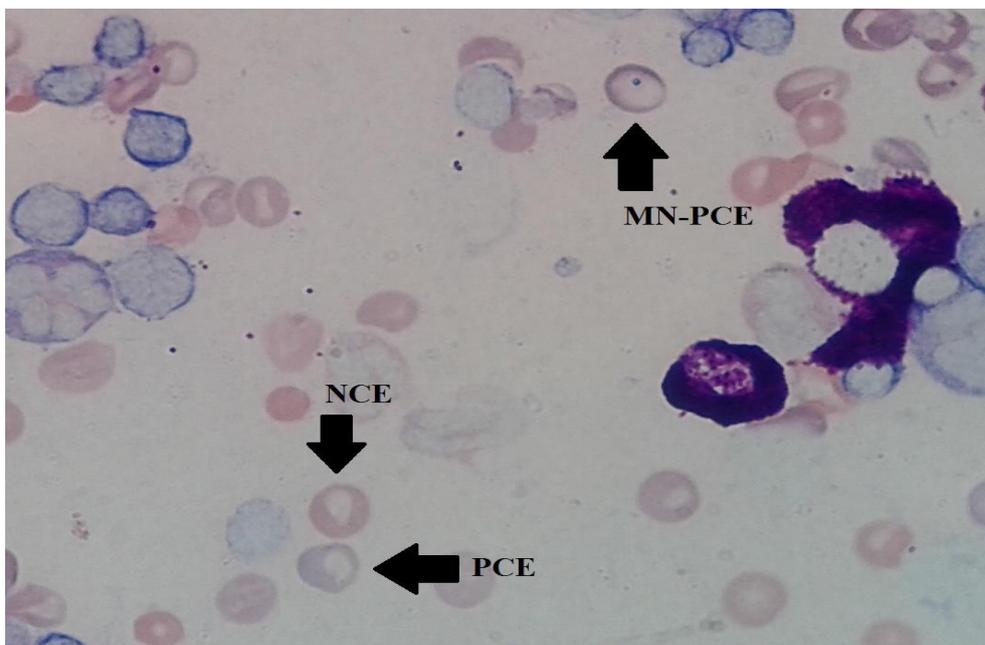
Fonte: o autor.

Figura 2. Classificação dos cometas em leucócitos de sangue periférico de um animal controle positivo.



Fonte: o autor.

Figura 3. Eritrócito policromático (PCE), normocromático (NCE) e policromático micronucleado (MN-PCE) em medula óssea de um animal controle positivo.



Fonte: o autor.

Tabela 1. Informações sobre o ciclo estral de ratas.

Ciclo Estral				
	Metaestro	Diestro	Proestro	Estro
Fase	Transitória	Pré-ovulatória	Ovulatória	Pós-ovulatória
Duração	21h	57h	12h	14h
Característica hormonal	Fase não fértil do ciclo. O estradiol, o FSH, a progesterona e o LH estão diminuídos.	Fase não fértil do ciclo. O estradiol, o FSH e o LH estão diminuídos. Oscilação de concentração de progesterona.	O LH, a prolactina e o FSH estão elevados. Aumento dos estrógenos, culminando na ovulação.	A fêmea está sexualmente receptiva ao macho. Altos níveis estrogênicos e baixos níveis de progesterona.
Característica citológica	Presença de leucócitos, muco e resíduos de células queratinizadas.	Predomínio de leucócitos e presença de algumas células nucleadas.	Predomínio de células epiteliais nucleadas. Ausência total de leucócitos.	Predomínio de células queratinizadas. Ausência total de leucócitos.

Fonte: o autor.

Baseado em: MOURA, M. R. **Avaliação da toxicidade reprodutiva e sistêmica do látex de *Himatanthus succuba* (Spruce) Woodson em roedores.** 2016. 60 f. Dissertação (Mestrado). Universidade Federal do Piauí. Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal. Teresina. 2016.

Figura 4. Esfregaço vaginal confirmando a prenhez pela presença de espermatozoides.



Fonte: o autor.

Figura 5. Cornos uterinos da fêmea n2 do grupo controle negativo. É possível observar onze pontos de implante e duas reabsorções visíveis.



Fonte: o autor.

Figura 6. Ovário direito da fêmea n2 do grupo controle negativo. É possível observar a contagem de seis corpos lúteos.



Fonte: o autor.

Figura 7. Feto com alteração macroscópica (hematoma), na fêmea n8 do grupo 1000 mg/kg/dia.



Fonte: o autor.

Figura 8. Feto normal (esquerda) e feto com atraso de desenvolvimento (direita) e suas respectivas placentas, na fêmea n6 do grupo controle negativo.



Fonte: o autor.

Figura 9. Feto após processamento com vermelho de alizarina, pronto para contagem dos pontos de ossificação e análise esquelética.



Fonte: o autor.