

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

**Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do óleo da  
semente de *Pachira aquatica* Aublet**

**JHONY MOREIRA MARCELINO**

**Dourados - MS  
2018**

JHONY MOREIRA MARCELINO

Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do óleo da semente  
de *Pachira aquatica* Aublet

Área do CNPq: Medicina II

Dissertação 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 Mestre em Ciências da Saúde

Área de concentração: Farmacologia

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Silvia Aparecida Oesterreich

Dourados - MS  
2018

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP).**

M314a Marcelino, Jhony Moreira

Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do óleo da semente de *Pachira aquatica* Aublet / Jhony Moreira Marcelino -- Dourados: UFGD, 2018.

104f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Silvia Aparecida Oesterreich

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde)-Universidade Federal da Grande Dourados

Inclui bibliografia

1. Estudos pré-clínicos. 2. Malvaceae. 3. Fitoterápicos. 4. Doses repetidas. 5. Mutagenicidade. 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 **DISSERTAÇÃO DE MESTRADO** APRESENTADA POR JHONY MOREIRA MARCELINO, ALUNO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS DA SAÚDE, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO "**FARMACOLOGIA**", REALIZADA NO DIA 05 DE SETEMBRO DE 2018.

Ao quinto dia do mês de setembro do ano de dois mil e dezoito (05/09/2018), às 08h30, em sessão pública, realizou-se, na sala 103/05 do Bloco C da Universidade Federal da Grande Dourados, a Defesa de Dissertação de Mestrado intitulada "Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do óleo da semente de *Pachira aquática Aublet*." apresentada pelo mestrando JHONY MOREIRA MARCELINO, do Programa de Pós-Graduação Mestrado em Ciências da Saúde, à Banca Examinadora constituída pelos professores **Dra. Silvia Aparecida Oesterreich** (Presidente/orientador), **Dr. Frederico Somaio Neto** (membro externo), **Dra. Raquel dos Santos Donatini** (membro externo) e **Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira** (membro interno). Iniciada sessão, a presidência deu a conhecer ao candidato e aos integrantes da Banca as normas a serem observadas na apresentação da Dissertação. Após o candidato ter apresentado a sua Dissertação, 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 o candidato considerado **APROVADO**, fazendo *jus* ao título de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**. Nada mais havendo a tratar, lavrou-se a presente ata, que vai assinada pelos membros da Banca Examinadora.

Dourados, 05 de setembro de 2018.

Dra. Silvia Aparecida Oesterreich \_\_\_\_\_

Dr. Frederico Somaio Neto \_\_\_\_\_

Dra. Raquel dos Santos Donatini \_\_\_\_\_

Dra. Kelly Mari Pires de Oliveira \_\_\_\_\_

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

## **DEDICATÓRIA**

Dedico este trabalho à Deus,  
família e amigos. Sem vocês nada  
seria possível.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS, por me conceder a permissão de chegar até aqui, guiando minhas decisões e me dando toda força necessária para a concretização desse sonho. Agradeço a Ele por todas as pessoas que cruzaram meu caminho, e que, de alguma forma, contribuíram para a conclusão deste estudo, e de uma maneira especial agradeço:

À minha orientadora, Professora Dr<sup>a</sup> Silvia, pela oportunidade concedida de integrar a esse ambiente acadêmico, pela confiança depositada e pela pessoa humana e incentivadora, sendo um exemplo profissional que me estimulou a chegar onde estou hoje. Deixo aqui minha imensa gratidão.

Aos meus pais, Selma Regina Silveira Moreira e Aparecido Marcelino Dias, por ser meu alicerce moral que rege meu o caminho e que fazem o possível e o impossível para me oferecerem a oportunidade de estudar, por todo apoio quando precisei, por cada oração, cada abraço, acreditando e respeitando minhas decisões e nunca deixando que as dificuldades acabassem com os meus sonhos

Aos meus irmãos Viviany, Bruno e Giovany que torceram e acreditaram na conclusão dessa pós-graduação. Obrigado família, amo muito vocês.

Aos amigos Aline, João Paulo, Danielli, Ana Portela, Ramão, Jéssica's, Jacqueline e colegas da Universidade Federal da Grande Dourados pelos momentos de alegria e de toda ajuda no projeto, apoio, força diária e principalmente por todo carinho recebido.

Aos professores, coordenação e funcionários do Programa de Pós-Graduação por contribuírem de uma forma ou de outra pela conquista desse título.

Enfim a todos àqueles que fazem parte da minha vida e que são essenciais para eu ser nessa longa jornada, um ser humano melhor.

## **EPÍGRAFE**

“Tudo tem o seu tempo determinado,  
e há tempo para todo o propósito debaixo do céu.”

(ECLESIASTES 3:1)

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1 – Vista geral da *Pachira aquatica* Aublet (A); Flor da *Pachira aquatica* Aublet (B). Fonte: O autor .....20

Figura 2 – Frutos da *Pachira aquatica* Aublet (A); Semente de *Pachira aquatica* Aublet (B). Fonte: O autor .....21

Figura 3 – Ilustração da parte aérea da raiz (A); Estrutura química do isolado isohemigossipolona (B). Fonte: Shibatani et al. (1999).....22

Figura 4 – Óleo extraído da semente de *Pachira aquatica* (A); Óleo extraído da semente em temperatura ambiente (B). Fonte: O autor .....23

Figura 5 – Esfregação de medula óssea. Eritrócito policromático com micronúcleo (A). Eritrócito policromático sem micronúcleo (B). Eritrócito normocromático (C). Fonte: Ribeiro (2003) .....31

Figura 6 – Estrutura de um cometa com cabeça e cauda. Fonte: (Gontijo & Tice, 2003) ...32

Figura 7 – Diferentes danos ao DNA, com as 5 categorias que indicam o grau de lesão sofrido pelas células. Onde: 0= sem dano (< 5%); 1= baixo nível de dano (5-20%); 2= médio nível de dano; 3= alto nível de dano (40-95%); 4=dano total (95%). Fonte: Adaptado de Singh et al., (1988).....33

### Artigo I

Figure 1 - Histopathological evaluation of organs treated with *Pachira aquatica* seed oil in the short-term toxicity assay. HE (20X and 40X) .....75

### Artigo II

Figura 1. Fluxograma do esquema experimental utilizado no ensaio do micronúcleo e cometa .....99



Figura 2. Eritrócitos da medula óssea de ratos *Wistar*. (A e B) Eritrócitos policromática micronucleados (MN-PCE); (C) eritrócito policromático (PCE) e (D) Eritrócitos normocromáticos (NCEs).....99

Figura 3. Classe de cometas de células do sangue periférico. (A) Classe 0 (sem danos); (B) classe 1 (cauda com até o diâmetro da cabeça do cometa); (C) classe 2 (cauda tamanho médio, com duas vezes o diâmetro da cabeça); e (D) classe 3 (cauda longa maior que o dobro do tamanho da cabeça). Amostra de animal do grupo de controle positivo ..... 100

Figura 4. Resultados do tratamento do OSPA e do controle positivo (ciclofosfamida) nas contagens de MN-PCEs usando a medula óssea de fêmeas (a) e machos (b) em ratos *Wistar*. Dados expressos como médias  $\pm$  SEM (n = 5) do número de MN-PCEs no ensaio de micronúcleos. \*\*\* Diferencia do grupo controle positivo, p <0,05 (one-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey,). Um total de 2000 células foram analisadas em cada animal. MN-PCEs, eritrócitos policromáticas micronucleadas ..... 101

Figura 5. Resultados do tratamento do OSPA e do controle positivo (ciclofosfamida) na relação entre PCEs / NCEs a partir da medula óssea de fêmeas (a) e macho (b) de ratos *Wistar*. Dados expressos como média  $\pm$  SEM (n = 5) da razão PCEs / NCEs no ensaio de micronúcleos. \*\*\* Diferencia o grupo de controle positivo; p <0,05 (one-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey). Um total de 200 células foram analisadas em cada animal. PCEs / NCEs, policromáticos para eritrócitos normocromáticos ..... 101

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 - Critérios para classificação de substâncias na toxicidade oral aguda de acordo com Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de produtos químicos (GHS) .....27

### Artigo I

Table 1 - Fatty acids profile obtained in *Pachira aquatica* Aublet seed oil.....66

Table 2 - Body weight gain and water and feed consumption of rats orally treated with *Pachira aquatica* Aublet seed oil.....67

Table 3 - Body weight gain and feed and water consumption of rats after 14 consecutive days of the end of short-term toxicity period (satellite observation period). .....68

Table 4 - Absolute and relative organ weight (g / 100 g body weight) of rats orally treated with *Pachira aquatica* oil.....69

Table 5 - Biochemical indicators of rats orally treated with *Pachira aquatica* oil.....71

Table 6 - Hematological parameters of rats orally treated with *Pachira aquatica* oil.....72

Table 7 - Histopathological analysis of organs treated with *Pachira aquatica* oil on short-term toxicity. ....74

### Artigo II

Tabela 1 - Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratados com o óleo de *Pachira aquatica*. .....97

Tabela 2 - Efeitos do tratamento com óleo da semente de *Pachira aquatica* sobre índice e frequência de danos no DNA utilizando o sangue periférico de ratos *Wistar*. .....98

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

ALT	Alanina aminotransferase
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
AST	Aspartato aminotransferase
ATC	Toxicidade aguda de classe
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CG	Cromatografia gasosa
DL50	Dose letal média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
EM	Espectrometria de massas
ERO	Espécie reativa de oxigênio
FDA	Food and Drugs Administration
FDP	Fixed Dose Procedure
GGT	Gama-glutamyltranspeptidase
GHS	<i>Globally Harmonised System</i>
H&E	Hematoxilina e Eosina
HCl	Ácido clorídrico
HDL	Lipoproteína de alta densidade
IC	Ionização de chama
KOH	Hidróxido de potássio
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LOAEL	Menor dose com efeito adverso observado
LOEL	Menor dose com efeito observado
LPM	Baixo ponto de fusão
MgSO <sub>4</sub>	Sulfato de magnésio
MN	Micronúcleo
MNPCE	Eritrócito policromático micronucleado
NaCl	Cloreto de sódio
NaOH	Hidróxido de sódio

NCE	Eritrócito normocromático
NOAEL	Dose de efeito adverso não observado
NOEL	Dose de efeito não observado
OECD	<i>Organisation for Economic Cooperation and Development</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSPA	Óleo extraído da semente de <i>Pachira aquatica</i> Aublet
PAA	<i>Pachira aquatica</i> Aublet
PCE	Eritrócito policromático
RBC	Eritrócitos
RDW	Largura da distribuição dos eritrócitos
SCGE	Células únicas em gel de eletroforese
SMART	<i>Somatic Mutation and Recombination Test</i>
UDP	<i>Up and Down</i>
WBC	Leucócitos

## **Avaliação da toxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade do óleo da semente de *Pachira aquatica* Aublet**

### **RESUMO**

No Brasil, o aumento no uso de produtos naturais no aproveitamento alimentar e como opção medicinal tem sido amplamente relatado, porém grande parte dessas espécies não possuem estudos no que se refere a seu potencial tóxico e genotóxico para sua utilização segura e eficaz. *Pachira aquatica* Aublet é uma árvore que apresenta frutos e sementes que são consumidos no norte do Brasil, principalmente pela população da região Amazônica, onde se encontra em abundância, mas se distribuem nas demais regiões pelo seu uso na arborização de praças e jardins. Assim, o presente estudo avaliou as alterações toxicológicas pré-clínicas por meio dos ensaios de toxicidade aguda e a curto prazo, bem como as variações mutagênicas e genotóxica através do teste de cometa e micronúcleo em modelo animal e a partir do óleo extraído da semente da *Pachira aquatica* Aublet (OSPA). No teste de toxicidade aguda, ratos *Wistar* receberam por via oral a dose de 2000 mg/kg do OSPA em uma única administração. Para os ensaios da toxicidade a curto prazo, cometa e micronúcleo foram utilizados as doses de 250, 500, 1000 mg/kg e um grupo controle positivo tratado com ciclofosfamida para o ensaio de micronúcleo. Os resultados revelaram que o OSPA apresenta DL<sub>50</sub> acima de 2000 mg/kg e não demonstrou alterações significantes nas análises de toxicidade pré-clínica da aguda e a curto prazo, uma vez que não foram observadas alterações bioquímicas, hematológica, histopatológica e mudanças comportamentais que pudessem indicar uma toxicidade sistêmica. Ainda, o OSPA não apresentou atividade genotóxica e citotóxica como demonstrado pelo teste SMART nos descendentes do cruzamento de alta bioativação. Assim, nas doses tratadas conclui-se que o OSPA não apresenta sinais de toxicidade após a exposição aguda e a curto prazo em ratos fêmeas e machos.

**Palavras-chave:** Estudos pré-clínicos; *Malvaceae*; Fitoterápicos; Doses repetidas.

## **Evaluation of toxicity, genotoxicity and mutagenicity of *Pachira aquatica* Aublet seed oil**

### ***ABSTRACT***

In Brazil, the raise in natural products uses for food intake and as a medicinal option has been widely reported, however a huge majority of these species have no written reports regarding their toxic and genotoxic potential for a safe and effective usage. *Pachira aquatica* Aublet is a tree that presents fruits and seeds which are consumed in the North of Brazil, mainly by the Amazonian population where it can be found in abundance, but are broadcast in the other regions by their role in the afforestation of squares and gardens. Thus, the following study evaluation the preclinical toxicological changes through the acute and short-term toxicity tests, and evaluated mutagenic and genotoxic variations over the comet and micronucleus tests using an animal model with the oil extracted from the *Pachira aquatic* Aublet seed (OSPA). In the acute toxicity test, Wistar rats received oral the OSPA dose of 2000 mg / kg / body weight in a single administration. For the short-term toxicity, comet and micronucleus tests the doses of 250, 500, 1000 mg / kg and a positive control group treated with cyclophosphamide for the micronucleus assay were used. The results showed that the OSPA had an LD 50 of more than 2000 mg / kg and did not show any significance in the preclinical and short-term toxicity analyzes, since they were not observed Biochemical, hematological, histopathological and behavioral alterations that could indicate toxicity systemic. Also, the OSPA did not present genotoxic and cytological activity as demonstrated by the SMART test in the offspring of the high bioactivation crossover. Thus, in the treated doses it is concluded that OSPA shows no signs of toxicity after acute and short-term exposure in female and male rats.

**Keywords:** Preclinical studies; *Malvaceae*; Phytotherapy; Repeated doses.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	15
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	16
2.1 Óleos vegetais .....	16
2.2 Família <i>Malvaceae</i> e Subfamília <i>Bombacoideae</i> .....	18
2.3.1 Considerações gerais sobre <i>Pachira aquatica</i> Aublet.....	19
2.3.2 Caracterização morfológica.....	19
2.3.3 Propriedades nutricionais e atividades biológicas.....	21
2.3.4 Óleo da semente .....	23
2.4 Estudos Toxicológicos .....	24
2.4.1 Ensaios pré-clínicos para alimentos e fitoterápicos .....	24
2.4.2 Toxicidade aguda .....	25
2.4.3 Toxicidade a curto prazo .....	27
2.4.4 Genotoxicidade e mutagenicidade .....	29
2.4.4.1 Teste do micronúcleo .....	30
2.4.4.2 Teste de Cometa – <i>Single Cell Gel Electrophoresis</i> (SCGE) .....	32
2.4.4.3 Teste para detecção de Mutação e Recombinação somática (SMART) .....	33
3. OBJETIVOS .....	35
3.1 Geral .....	35
3.2 Específicos .....	35
4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	36
5. APÊNDICES .....	44
5.1. Artigo I: Acute and short-term toxicity in rats orally treated with <i>pachira aquatica</i> Aublet seed oil .....	45
5.2. Artigo II: Avaliação da segurança do óleo da semente de <i>Pachira aquatica</i> Aublet: análise do potencial genotóxico e clastogênico.....	76
6. CONCLUSÕES.....	102
7. ANEXOS.....	103
7.1. Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) .....	104

## 1 INTRODUÇÃO

Na área alimentar e no campo industrial, a procura por óleos e gorduras vegetais que apresentem boa qualidade e baixo custo tem aumentado significativamente. Paralelo a isso, indústrias alimentícias, farmacêuticas e cosméticas vêm trabalhando na elaboração de produtos, insumos e ativos extraídos desses vegetais para o emprego alimentar ou como terapia alternativa com a finalidade de atender as necessidades populacionais (BALBINOT et al., 2006).

*Pachira aquatica* Aublet é uma árvore pertencente à subfamília *Bombacoideae* da família *Malvaceae*, provinda do sul do México até a área Norte da América do Sul (APG II, 2003). Popularmente é conhecida como mongubeira, munguba, cacau selvagem, cacau falso e vários outros nomes que variam de acordo com a região na qual é encontrada (SOUZA; LORENZI; FLORA, 2008). Apresentam como habitat natural as matas ciliares e terrenos alagadiços, mas possuem características que facilitam sua adaptação em solos menos úmidos e diferentes climas (PEIXOTO; ESCUDEIRO, 2002).

Por ser uma árvore frondosa é amplamente utilizada na arborização de cidades do interior do país, e atrai atenção por suas flores exóticas. No México, infusões das cascas de *Pachira aquatica* são empregadas pela medicina popular no tratamento de diabetes (ANDRADE-CETTO; HEINRICH, 2005).

Entre as atividades biológicas comprovadas da *Pachira aquatica*, o isolado isoemigossipolona, presente na casca da raiz, possui ação antifúngica contra *Pythium ultimum* e *Cladosporium herbarum* (SHIBATANiet al., 1999). Esta ainda pode inibir o crescimento de *Crinipellis pernicioso* a partir do extrato clorofórmico e de *Fusarium sp* a partir do extrato etanólico das sementes (MOREIRA et al., 2002; SOUZA et al., 2014).

Na área alimentar, o consumo dos seus frutos e de suas sementes (amêndoas) é apreciado na região norte do Brasil, onde são consumidos de forma *in natura*, torrados, cozidos ou assados, por serem nutritivos e apresentarem características organolépticas desejadas, mas não são empregados com valor na exploração econômica (CAMARGO, 2008; JORGE; LUZIA, 2012; LORENZI et al., 2006).

Seus frutos apresentam compostos bioativos com atividades antioxidantes, exibindo quantidades significativas para consumo diário de flavonoides do tipo amarelo e antocianinas e quantidades reduzidas de carotenoides como  $\beta$ -caroteno e licopeno, o que torna o consumo do fruto pertinente (SILVA et al., 2015a). Ainda suas sementes apresentam um bom



percentual de proteínas para ingestão diária e uma elevada quantidade em lipídios, sendo o ácido palmítico predominante entre os ácidos graxos saturados (OLIVEIRA et al., 2000).

Estudos envolvendo outras espécies da família *Malvacea*, revelaram no óleo de *P. insignes* alta toxicidade, devido às várias alterações fisiológicas acometidas em animais em experimento, se mostrando impróprio para consumo humano (BERRY, 1980; PEREIRA et al., 2002).

Como todas as substâncias podem ser consideradas como um agente tóxico de acordo com as condições de exposição e dose utilizada, testes de toxicidade são empregados na obtenção de informações de um perfil toxicológico, após uma única dose ou a exposições repetidas, estabelecendo sua severidade, dose limite, órgãos afetados e possíveis efeitos reversíveis. Testes como toxicidade pré-clínica, ensaio cometa e teste de micronúcleo de células da medula óssea de ratos, estão entre os métodos mais acessíveis para determinação de um possível efeito tóxico, genotóxico e citotóxico (BÜCKER et al., 2006; RANK et al., 2002).

Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar o perfil toxicológico do OSPA em modelos experimentais de toxicidade aguda, toxicidade a curto prazo, teste do micronúcleo e ensaio cometa em ratos *Wistar* e do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*. Os resultados dos ensaios pré-clínicos indicarão a segurança e eficácia do uso do OSPA para consumo humano bem como subsidiarão as fases 1, 2 e 3 da pesquisa clínica.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Óleos vegetais**

A produção e a industrialização de óleos vegetais apresentam alta relevância para os setores agroindustriais e alimentícios, devido à ampla aplicação destes produtos como matéria-prima no desenvolvimento de alimentos para o uso animal e humano (FREITAS; BARBOSA; FRANCA, 2000).

O aumento no uso de óleos vegetais tem estimulado o interesse na busca de diferentes formas de extração, visando qualidade, estabilidade no produto obtido e baixo custo operacional. Usualmente a extração de óleos vegetais a partir de sementes oleaginosas se dá por prensagem mecânica ou utilização de solventes (FREITAS et al., 2008). Grande parte dos óleos vegetais utilizados na alimentação são obtidos de grãos e sementes como de soja,

algodão, milho, canola, girassol e amendoim ou extraídos de frutos como dendê, azeitona e coco que geralmente fornecem ácidos graxos de boa qualidade e baixo custo (GUNSTONE, 2011).

São inúmeras as oleaginosas empregadas na produção de óleos comestíveis, isso devido sua importância como fonte de energia no equilíbrio fisiológico do organismo humano. Óleos vegetais como de palma, soja e canola estão entre as mais produzidas mundialmente e consideradas as principais em comercialização e produção, fornecendo aminoácidos essenciais, vitaminas e propriedades sensoriais como textura, sabor e aroma aos alimentos (FAO, 2013; MANDARINO et al., 2005).

O óleo de palma ou dendê (*Elaeis guineensis*) apresenta características de resistência à oxidação pela alta concentração de ácidos graxos saturados e baixo ponto de fusão, não necessitando ser hidrogenado para se obter a forma pastosa, o que evita a formação de ácidos graxos *trans*. Grande parte da produção do óleo é encaminhada a indústrias alimentícias para o emprego de gorduras em sorvetes, bolos, chocolates, biscoitos, margarinas e por apresentarem características químicas que reduzem o LDL-colesterol e aumentam o HDL-colesterol (SANTOS et al., 2013).

A soja (*Glycine max*) é um produto agrícola com alto valor econômico no mercado internacional e nacional por apresentar grande variedade de produtos na alimentação animal e humana (KURAM ET AL., 2013). Segundo a Embrapa (2017), Estados Unidos da América é o maior produtor mundial de soja seguido pelo Brasil. O consumo do óleo de soja possui vantagens por apresentar ácidos graxos essenciais, como o ácido linolênico ( $\omega$ -3 e  $\omega$ -6) e vitaminas do tipo A, E e de esteróis (MANDARINO et al., 2005; MORAIS; SILVA, 2000).

Canola é um termo popular internacional, empregado para óleos, farinhas e sementes geneticamente modificadas oriundas da colza. A utilização do óleo de colza na alimentação humana se tornou restrita devido ao elevado teor de ácido erúico (C 22:1) e glucosinolato. Estudos em animais evidenciaram que o ácido erúico pode causar diversas lesões cardíacas e o ácido glucosinolato, redução nos valores nutritivos quando empregado na alimentação (CORDEIRO, 1997; LAJOLO, MARQUEZ; FILISETTI-COZZI; MCGREGOR, 1991). Assim, o melhoramento genético da colza resultou em um óleo com baixos níveis do ácido erúico, glucosinolato e de gorduras saturadas, passando a ser chamada de canola (*Canadian oil low acid*). O óleo extraído da canola possui alto teor de vitamina E (antioxidante), ômega-3 (reduz os triglicérides), gorduras monoinsaturadas (reduz LDL) e baixo teor de gordura saturada (controle do colesterol), o que torna a utilização do óleo bastante atraente (TOMM, 2007).

Estudos vêm demonstrando que as sementes oleaginosas da família *Malvaceae* apresentam ácidos graxos ciclopropenoídicos, sendo os ácidos malvárico (ácido 8,9-metilenooctadec-8-enóico) e o estercúlico (ácido 9,10-metilenooctadec-9-enóico) os mais prevalentes (BAILEY, 1996; RAO; JONES; RIVETT; TUCKER, 1989). Estes ácidos tornam as sementes impróprias ao consumo humano por terem efeitos carcinogênicos, mas sua concentração é quem determinará a qualidade da amostra, em vista que esses valores se alteram de acordo com os fatores ambientais de solo, clima, condições de desenvolvimento e, conseqüentemente, de acordo com a forma de extração (CHAVES et al., 2004; FEUGE; CODIFER; ZERINGUE, 1981).

## 2.2. Família *Malvaceae* e Subfamília *Bombacoideae*

*Pachira aquatica* Aubl é uma árvore originalmente pertencente à família das *Bombacaceae*, mas que passou a ser incluída na família *Malvaceae*, de acordo com o sistema de categorização proposto pelo APG II (*Angiosperm Phylogeny Group*), onde passou a integrar como uma subfamília da *Malvaceae*, a *Bombacoideae* (APG II, 2003).

A subfamília *Bombacoideae* apresenta aproximadamente 18 gêneros e 187 espécies, com maiores dominâncias neotropicais, distribuídas pelo México, América Central, estendendo-se pelas Antilhas até o sul América do Sul (BAYER; KUBITZKI, 2003). As diferentes espécies da família são encontradas especialmente em matas úmidas, sendo o Brasil e a Colômbia os locais de maior diversidade. No Brasil, apresentam cerca de 13 gêneros e 80 espécies distribuídas por todo território, favorecendo a economia regional (DUARTE, 2010). Compostos como cumarinas, alcaloides, e lignanas são citados como principais representantes da subfamília *Bombacoideae* (CRONQUIST, 1981; PAULA; BARBOSA; DEMUNER; PILO-VELOSO, 1997).

As espécies de *Bombacoideae* se destacam do ponto de vista natural, econômico e ecológico no Brasil, onde são utilizadas para diversos fins. Gêneros como *Eriotheca*, *Ceiba* e *Pseudobombax* apresentam frutos na qual sua paina é empregada como isolante térmico, no preenchimento de travesseiros, colchões e na confecção de boias de salva-vidas. Sua madeira é utilizada na produção de celulose, no revestimento de portas, compensados e na elaboração de forros e brinquedos. Na ornamentação de praças e jardins, são utilizadas a *Pachira aquatica* Aublet, *Ceiba speciosa* (A. St.- Hil.) Ravenna, e *Eriotheca*. Na alimentação, sementes de *Pachira aquatica* Aublet e *Pachira glabra* Pasq. são apreciadas e consumidas por humanos na forma cozida, crua, torrada ou na forma de farinha (DUARTE, 2010; LORENZI, 1992, 1998). Ainda espécies como *Ceiba pentandra* (L.) e *Adansonia digitata* L.

são utilizadas na medicina popular africana por apresentarem atividade diurética, analgésica e antipirética (PAULA et al., 1997).

### **2.3.1 Considerações gerais sobre *Pachira aquatica* Aublet**

A espécie *Pachira aquatica* Aublet é uma frutífera conhecida popularmente como munguba, mongubeira, mamurana, castanheira, castanheira do Maranhão, castanheira da Guiana, paineira de Cuba, cacau selvagem, cacau gigante e cacau falso (LORENZI, 2006; SARTORI; BACHER; LACERDA, 2006; SILVA; ALVES; MATOS, 2012).

Usualmente *Pachira aquatica* Aublet é encontrada em praças, jardins e na arborização urbana de diversas cidades do Brasil, sendo pouco encontrada em seu ambiente natural, que são terrenos sujeitos a alagações periódicas e à beira de lagos e rios (LORENZI, 2006; SARTORI et al., 2006; SILVA et al., 2012). Mesmo com preferências por locais mais úmidos, a planta se adapta a diferentes tipos de climas e condições distintas, sendo facilmente cultivada. Podem produzir uma grande quantidade de frutos e sementes que são consumidas de diferentes formas por possuírem sabor e aroma agradável (JORGE; LUZIA, 2012).

Nas Antilhas e nas Guianas, as sementes de *Pachira aquatica* são descascadas e trituradas para obtenção de uma farinha bastante nutritiva e moídas na obtenção de uma bebida que substituí o café e chocolate. Ainda, existem relatos que suas sementes também são utilizadas na adulteração do cacau (CORRÊA, 1984).

A espécie foi introduzida no Brasil na arborização urbana através do botânico francês Glaziou, na segunda metade do século XIX, e se expandiu em estados como Rio de Janeiro e São Paulo pelo paisagista Roberto Burle Marx e pelo botânico Luiz Emygdio, durante a década de 60 e desde então, vem se distribuindo às demais regiões brasileiras (PEIXOTO; ESCUDEIRO, 2002).

### **2.3.2 Caracterização morfológica**

Em decorrência da espécie ser encontrada em diferentes regiões, seus frutos e sementes podem apresentar variabilidade nas características físicas e químicas como também no tamanho e quantidade dos frutos e sementes (CRUZ; CARVALHO, 2003). A *Pachira aquatica* Aublet apresenta porte arbóreo (6 a 14 m) com copa oval, caule (Figura 1).



Figura 1 - Vista geral da *Pachira aquatica* Aublet (A); Flor da *Pachira aquatica* Aublet (B).  
Fonte: O autor.

Suas flores são bastante exóticas, com pétalas anexadas a vários estames projetados para fora, estigma projetado anteriormente aos estames e a corola aberta. Suas pétalas possuem cor castanho-amareladas, com estames de coloração branca na região basal e róseo-avermelhados em sentido ao ápice. Suas flores ainda liberam um cheiro adocicado que atraem vários insetos e animais como pássaros e morcegos (FAEGRI, 1979; PEIXOTO; ESCUDEIRO, 2002).

Seus frutos são do tipo cápsula septicida, deiscente com formato oval, coloração castanho-escuro, epicarpo glabro e com ausência de brilho (Figura 2). Seu pericarpo apresenta fendas longitudinais apresentando cinco septos. Os frutos são semelhantes ao cacau (*Theobroma cacao* L.), de onde vem o nome popular da planta, cacau falso e cacau gigante (SILVA et al., 2012).

Cada fruto produz uma grande quantidade de sementes que estão inseridas no eixo central do fruto e variam de coloração, tamanho e unidade por fruto. As sementes variam de reniformes a angulosas, podendo diversificar de 2 a 18 sementes, com coloração variando durante o estado de maturação do esbranquiçado ao castanho-escuro. A germinação é do tipo epígea fanerocotiledonar, se iniciando pelo surgimento de raiz que se desenvolve rapidamente rompendo o tegumento (PEIXOTO; ESCUDEIRO, 2002; SILVA et al., 2012).



Figura 2 - Frutos da *Pachira aquatica* Aublet (A); Semente de *Pachira aquatica* Aublet (B).  
Fonte: O autor.

### 2.3.3 Propriedades nutricionais e atividades biológicas

Estudos mostraram que as sementes de *Pachira aquatica* possuem propriedades funcionais que permitem a utilização de isolados proteicos em produtos alimentícios que demandam alta solubilidade, como massas em geral, produtos de panificação, produtos emulsificantes e em produtos que necessitam exibir ação na absorção do óleo (SILVA; AZEVEDO; AZEVEDO, 2015).

Suas sementes são ricas em lipídios, carboidratos e apresentam um percentual significativo de proteínas. Entre os ácidos graxos encontrados na semente destacam-se o ácido palmítico e em menores quantidades o ácido esteárico, linoleico e oleico. Constatou-se a presença de proteínas com valores altos de triptofano, mas que sua composição e atividade biológica ainda devem ser analisadas e estudadas detalhadamente (JORGE; LUZIA, 2012; PEREIRA et al., 2002; POLIZELLI; FACCHINI; CABRAL; BONILLA-RODRIGUEZ, 2008).

Segundo Silva (2015), biscoitos do tipo *cookie* produzidos com 50% da gordura de *Pachira aquatica* e 50% da amêndoa de bacuri possuíram características sensoriais e microbiológicas aceitáveis, e elevados teores de fibra alimentar, lipídios, proteínas e carboidratos, indicando a *Pachira aquatica* como uma possível alternativa para o uso alimentar.

Uma análise realizada com base na composição nutricional do farelo das sementes de *Pachira aquatica* como fonte de proteína dietética revelou nas sementes presença de fatores

antinutricionais, como lectina e inibidores de tripsina. Nos ratos que receberam o farelo da semente em forma de dieta associado a clara do ovo, houve perda de apetite, peso e hipertrofia de vários órgãos, sendo o pâncreas e os rins mais afetados, o que sugere estar relacionado aos fatores antinutricionais ou em ação conjunta a outros compostos não identificados. Esses fatores antinutricionais geralmente são inativados por tratamentos térmicos e destruídos em condições normais de preparo industrial e doméstico (OLIVEIRA et al., 2000).

Estudos a respeito das possíveis atividades biológicas de *Pachira aquatica*, revelaram no extrato etanólico das folhas e fruto atividade sequestradora de radicais como 2,2-difenil-1-picrilhidrazila (DPPH), podendo ser aproveitado como um possível antioxidante na alimentação (VIEIRA, 2010).

Isolados da planta como o isohemigossipolona (Figura 3B) encontrado na casca externa da raiz de *Pachira aquatica* (Figura 3A), demonstraram potencial fungicida (SHIBATANI et al., 1999). Souza et al. (2014), constataram que o extrato etanólico das sementes de *Pachira aquatica* possui ação inibitória para *Fusarium sp.*, fungo encontrado em plantas e solo. Ainda, foram encontradas no tronco de *Pachira aquatica* atividade fungicidas sobre *Pythium ultimum* (Var.), *Aspergillus flavus* (Gray), *Cladosporium herbarum* (Pers.), *Rhizoctonia solani* (Kuhn) e sobre *Crinipellis pernicioso*, fungo causador da vassoura-de-bruxa, uma doença que atinge o cacaueteiro (SHIBATANI et al., 1999; MOREIRA et al., 2002).

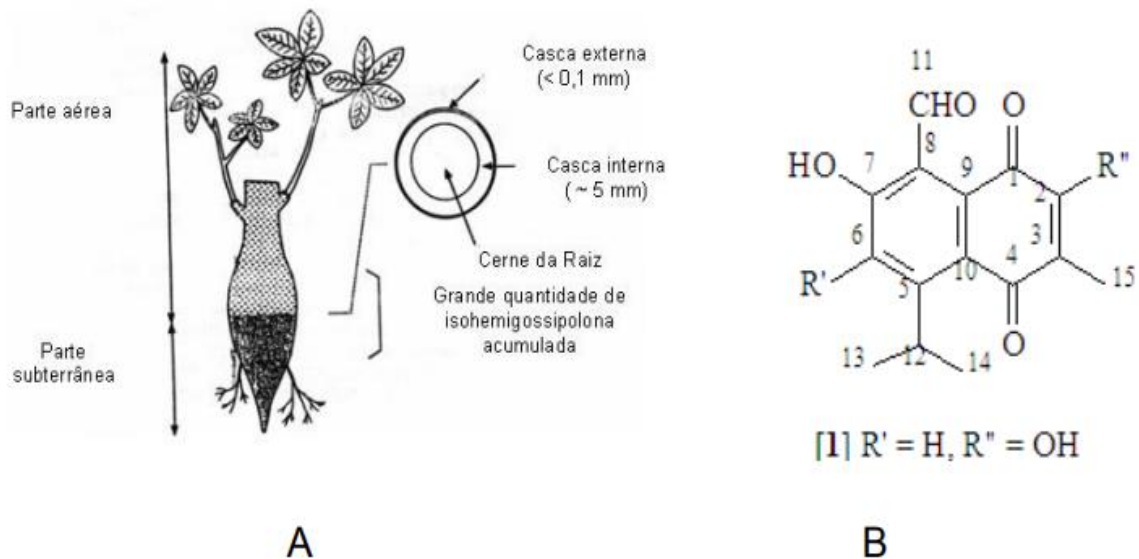


Figura 3 - Ilustração da parte aérea da raiz (A); Estrutura química do isolado isohemigossipolona (B). Fonte: Shibatani, et al (1999).

### 2.3.4 Óleo da semente

Estudos sobre a caracterização do óleo da semente de *Pachira aquatica* vêm revelando valores com alto teor de lipídios e demonstrando um bom aproveitamento industrial. No presente estudo o rendimento do OSPA foi de  $31,2 \pm 0,2$ , superior ao encontrado para o óleo de dendê (22%) e de soja (18%) (MOURAD, 2006; CHRISTOFF, 2006).

Segundo Silva (2015), o OSPA apresenta 56,12% de ácidos graxos saturados e 39,31% de ácidos graxos insaturados dos quais 26,16% se apresentam como monoinsaturados e 13,15% poliinsaturados. Os ácidos graxos saturados possuem capacidade de apresentar alta resistência à oxidação o que preserva os demais ácidos presentes no óleo (SANTOS et al., 2013; WATERLOW, 2010). Entre os ácidos graxos majoritários do perfil lipídico destacam-se o ácido palmítico seguido do oleico e linoleico (JORGE; LUZIA, 2012; SILVA, 2011).

O OSPA após a extração se apresenta no estado líquido (Figura 4a), mas durante sua exposição à temperatura ambiente se torna sólido formando uma gordura (Figura 4b), devido principalmente ao ácido palmítico, que possui um ponto de fusão em torno de 63 °C. Ainda, de acordo com sua propriedade química, pode ser empregado na fabricação de cosméticos e em produtos alimentícios que exijam características de maciez e crocância, podendo servir como um substituto da gordura animal.

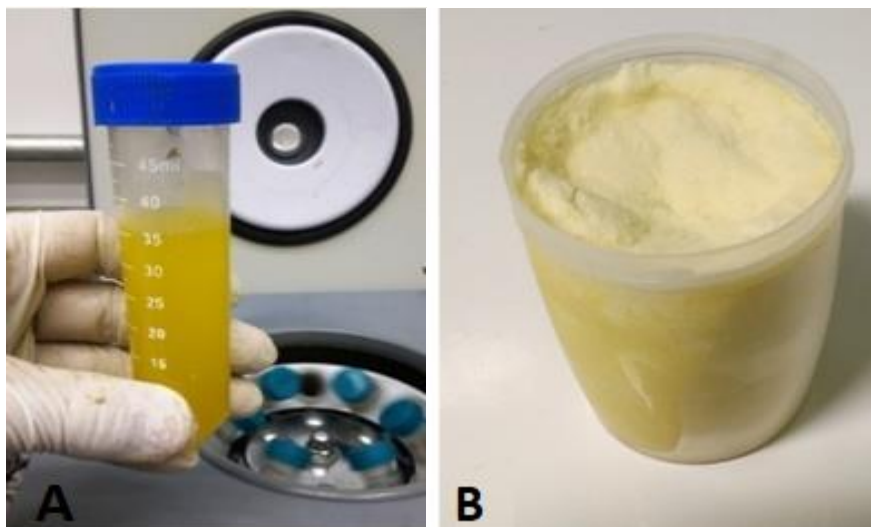


Figura 4 - Óleo extraído da semente de *Pachira aquatica* (A); Óleo extraído da semente em temperatura ambiente (B). Fonte: O autor.

Jorge e Luzia (2012), analisando as características físico-químicas do óleo da *Pachira aquatica* mencionaram semelhança a óleos comestíveis, como o de amendoim e palma, o que tornaria a espécie uma boa fonte para o consumo humano. Estudo realizado por Bum et al.



(2009) mostrou resultados promissores para o óleo revelando potencial para obtenção do biodiesel.

## **2.4 Estudos Toxicológicos**

### **2.4.1 Ensaios pré-clínicos para alimentos e fitoterápicos**

Ao longo do tempo, a busca por novas fontes de produtos de origem vegetal, tem sido responsável pelo aumento do uso de plantas na área alimentar e no tratamento de diferentes enfermidades, assim, criou-se a imagem de que alimentos e remédios obtidos de fontes naturais são totalmente seguros, eficazes e sem efeitos tóxicos. Mas, as plantas por se tratarem de xenobióticos, podem produzir derivados de sua biotransformação altamente tóxicos (LAPA et al., 1999). Logo, os recursos derivados de plantas para o uso alimentar e medicinal não estão isentos de efeitos adversos, o que torna os estudos toxicológicos altamente relevantes e necessários na determinação dos níveis de toxicidade e dos efeitos colaterais associados ao consumo (SILVA; DIEDRICH; BOLZAN; GIACOMELLI, 2012).

Nos Estados Unidos, as manipulações a base de plantas são intituladas como suplementos nutricionais, não sendo exigidas análises de eficácia e segurança pelo órgão regulador do país (*Food and Drug Administration - FDA*) para a comercialização (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Ainda nos Estados Unidos, os alimentos podem ser classificados como alimentos funcionais, termo também aceito na Europa e no Brasil. Neste contexto, os alimentos funcionais devem exibir inicialmente funções sensoriais e nutricionais, além de nutrientes que exerçam uma função fisiológica benéfica ao organismo (KWAK; JUKES, 2001; MORAES; COLLA, 2006).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) junto ao Ministério da Saúde, regulamentou a aplicabilidade dos alimentos funcionais através de algumas resoluções: ANVISA/MS 16/99, tratando sobre os procedimentos para o registro de alimentos e novos ingredientes, ANVISA/MS 17/99, abordando as diretrizes para avaliação de risco e segurança dos alimentos com base em estudos e evidências científicas, ANVISA/MS 18/99, com as diretrizes para análise e comprovação de propriedades funcionais e de saúde, mencionadas na rotulagem de alimentos e ANVISA/MS 19/99, aprovando o regulamento técnico de procedimentos para registro de alimentos com alegação de propriedades funcionais e de saúde presente em rótulos (BRASIL, 1999a; 1999b; 1999c; 1999d).

A legalização para o registro de um alimento funcional só pode ser efetuado após a comprovação das características funcionais com base nos valores adquiridos, forma de uso,

valor nutricional e evidências científicas, como caracterização molecular ou composição química, ensaio nutricional, análise bioquímica, fisiológica e toxicológica em animais de experimentação, dados da literatura científica evidenciando seu uso sem associação de danos à saúde (Brasil, 1999c; 1999d; PIMENTEL, et al., 2005).

Entre os estudos não clínicos de segurança para o uso de plantas no consumo humano proposto pela ANVISA, estão os estudos de toxicidade de dose única (aguda), toxicidade de doses repetidas, toxicidade reprodutiva, genotoxicidade, carcinogenicidade e tolerância local (ANVISA, 2013).

Quanto aos fitoterápicos, no Brasil, o órgão regulador é a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a qual dispõe normas para o uso e comercialização de fitoterápicos. Com a portaria nº 6 de 1995, a ANVISA estabeleceu prazos para implementação de dados de eficácia e segurança dos medicamentos a base de plantas medicinais as indústria farmacêutica e Portaria nº 18 de 2004, os registros dos medicamentos fitoterápicos. Através da publicação da RDC nº 48/2004, passou a igualar os fitoterápicos aos medicamentos, requerendo ensaios clínicos para seu registro (ANVISA, 1995; 2004). Ainda no ano de 2004, foi publicada a Resolução nº 90, como um guia para realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos. No ano de 2013, outro guia foi formulado estabelecendo os diversos testes pré-clínicos a serem realizados para o desenvolvimento de medicamentos e sua condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Esses protocolos foram elaborados em consonância com as regras exigidas pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) e pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (ANVISA, 2013). Segundo a ANVISA (2010), os protocolos internacionais foram desenvolvidos e reconhecidos por especialistas com o objetivo de garantir a segurança e a credibilidade às diversas análises de toxicidade, de forma a se tornarem os mais confiáveis possíveis.

#### **2.4.2 Toxicidade aguda**

A análise de toxicidade aguda tem por finalidade avaliar o perfil toxicológico produzido por uma substância teste, quando essa é administrada em uma ou mais doses em um curto período de tempo, sendo esse de no máximo 24 horas, seguido da observação dos animais por no mínimo 14 dias após administração da mesma. As análises de toxicidade aguda devem ser realizadas previamente a fase à fase I da pesquisa clínica (ANVISA, 2013).

O teste da toxicidade oral aguda permite estimar a dose letal mediana (DL<sub>50</sub> - dose que provoca a morte de 50% dos animais) de uma substância teste classificando-a quanto a sua

periculosidade. O teste da  $DL_{50}$  foi elaborado inicialmente por Trevan em 1927, com o objetivo de determinar quais substâncias que seriam utilizadas por seres humanos. Posteriormente, em 1981, o teste foi alterado para reduzir o número de animais necessários nos ensaios, onde foi desenvolvido um novo *guideline* (diretriz) pela OCDE, o *guideline* “Nº 401” (OECD, 1987), e passou a ser utilizada na determinação do nível de toxicidade das substâncias teste, tornando-se pré-requisito para inúmeras agências reguladoras, como a FDA e a OECD (VALADARES, 2006).

Atualmente, os protocolos utilizados para os estudos de toxicidade aguda oral seguem as diretrizes estipulados pela OECD, sendo o protocolo 420 – Teste de doses fixas, (OECD 2001), diretriz 423, Toxicidade aguda de classe (ATC) e a 425 com o método “*Up and Down*” (UDP) (OECD, 2008).

O estudo do teste de doses fixas é empregado na identificação da menor dose que provavelmente não desencadeará sinais críticos de toxicidade após a exposição, via gavagem, nas doses estabelecidas de 5, 50, 300 e 2000 mg/kg do peso corporal. São utilizados 5 animais por grupo, preferencialmente fêmeas, pela maior sensibilidade às substâncias estranhas ao organismo quando comparado aos machos (OECD, 2011). O ensaio é encerrado quando a dose estabelecida causa sinais de toxicidade ou morte.

Na análise ATC são utilizadas as mesmas doses iniciais que o teste de doses fixas (5, 50, 300 e 2000 mg/kg/peso corporal), buscando a menor dose responsável por desencadear sinais de toxicidade ou morte do animal, assim como o ensaio de doses fixas, porém são empregados apenas 3 animais por grupo, preferencialmente fêmeas. Tendo ausência ou presença de morte, o tratamento deve prosseguir em mais 3 animais na maior, mesma ou menor dose até quando ocorrer o encerramento do teste. Tanto o teste de doses fixas quanto o ATC não permitem determinar o valor preciso da  $DL_{50}$ , porém a dose poderá ser classificada de acordo com os critérios do *Globally Harmonised System* (GHS) quanto a sua periculosidade (Tabela 1) (OECD 2001a, 2001b).

O GHS estabeleceu para a toxicidade aguda oral cinco categorias de acordo com a  $DL_{50}$ , estipulando o perigo que as substâncias podem causar a uma população vulnerável, sendo a categoria 1 a toxicidade mais crítica e a 5 a mais baixa, mas que podem apresentar riscos (ANVISA, 2016; AMENI, 2011).

Tabela 1 – Critérios para classificação de substâncias na toxicidade oral aguda de acordo com Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de produtos químicos

Toxicidade aguda (Oral)					
Toxicidade	Extrema Categoria 1	Alta Categoria 2	Moderada Categoria 3	Pouca Categoria 4	Improvável Categoria 5
Dose mg/kg	≤ 5	> 5 - 50	> 50 - 300	> 300 - 2000	< 2000 - 5000

Fonte: Adaptada de ANVISA (2016).

No método UDP, diferente dos ensaios ATC e FDP é possível estabelecer a medida da DL<sub>50</sub> com intervalos de confiança e classificar o perigo da substância pelos critérios da GHS. O tratamento dos animais deverá iniciar na dose mais baixa para que se possa buscar o valor da DL<sub>50</sub>. Na ausência de informações da toxicidade da substância de análise, é indicado uma dose inicial de 175 mg/kg/peso corporal. Em caso de evidências de baixa toxicidade da substância teste, o ensaio se inicia com a dose mais alta de 2000 mg/kg de peso corporal, avaliando a dose limite, e em casos excepcionais, quando justificada a dose de 5000 mg/kg pode ser administrada. O primeiro animal deve receber a dose inicial e ser observado durante 48 horas. Se o animal sobreviver e apresentar ausência de sinais de toxicidade a dose é aumentada e administrada em um segundo animal. Em caso de morte a dose regride em um fator de 3,2 (sequência de 1.75, 5.5, 17.5, 55, 175, 550, 1750, 5000 mg/kg). Este estudo, além de estimar de forma precisa a DL<sub>50</sub>, é um dos mais utilizados por agências reguladoras (OECD, 2008).

A escolha da análise a ser estabelecida deve ter como base a proposta a ser executada no estudo, podendo ser utilizado diferentes espécie de roedores, sendo o rato o animal de melhor escolha. As ratas fêmeas utilizadas nos ensaios devem ser nulíparas e não-prenhas, entre 8 a 12 semanas de idade (ANVISA, 2004; OECD 2008a).

Avaliar e registrar diariamente o consumo alimentar, hídrico, peso do animal e seus sinais toxicidade são de extrema importância para determinação da severidade dos sintomas tóxicos apresentados, determinando seu tempo de surgimento, progressão e reversibilidade. No final da análise, todos os animais devem ser submetidos à eutanásia e autopsiados para análise macroscópica dos órgãos. Em caso de serem observadas alterações nas autópsias, estudos histopatológicos dos órgãos devem ser realizados (ANVISA, 2004).

#### 2.4.3 Toxicidade a curto prazo

O estudo da toxicidade a curto prazo ou de doses repetidas tem como finalidade caracterizar o perfil toxicológicos das substâncias de análise pela administração repetida a

animais em um determinado tempo. O estudo permite identificar os órgãos alvos da toxicidade e como são afetados, os efeitos fisiológicos acometido nos animais, bioquímicos, hematológicos, histopatológicos e anatômicos, além de determinar o nível de dose sem observação de efeito adverso (NOAEL), a dose de efeito não observado (NOEL), a dose com efeito adverso observado (LOAEL) e a menor dose com efeito observado (LOEL). Ainda, auxiliam no desenho dos estudos de toxicidade crônica (OECD, 2008b; ANVISA 2013).

Segundo a ANVISA, para que o teste tenha validade é fundamental pelo menos duas espécies de mamíferos, sendo uma roedora e uma não-roedora, sendo que para OECD apenas uma espécie é necessária (ANVISA 2013; OECD, 2008b). O modelo animal também pode variar conforme o protocolo da agência reguladora, porém, sempre é dada preferência por roedores, em especial os ratos por serem a única espécie indicada para avaliar desreguladores endócrinos e resultar na menor variabilidade de resultados quando comparado a outros animais menores (AMENI, 2011).

Na análise s curto prazo cada grupo deve apresentar no mínimo dez animais, divididos entre machos e fêmeas (5 de cada) e manipulados da mesma forma, evitando falsos resultados (ANVISA, 2004; OECD, 2008b; ANVISA, 2013). Devem ser utilizados no mínimo três doses teste, respeitando a dose máxima de 1000 mg/kg/dia, um grupo controle e ainda indica-se a utilização de um grupo satélite com a maior dose tratada, com mais dez animais(5 machos e 5 fêmeas). As concentrações das doses poderão ter como base informações de estudos realizados na toxicidade aguda (OECD, 2008b; ANVISA, 2013).

Para a toxicidade oral em doses repetidas de 28 dias em roedores (protocolo nº 407), os animais devem receber as doses estabelecidas uma vez ao dia, não excedendo o volume máximo de 2mL/100g de peso corporal. As doses devem ser ajustadas de forma a manter um nível constante da substância em termos de peso corporal, sendo esta, administrada no mesmo horário todos os dias (OECD, 2008b).

O consumo hídrico e alimentar, o peso do animal e o exame clínico deverão ser registrados e analisados diariamente, preferencialmente nos mesmos horários. Os exames clínicos baseados no *screening* hipocrático deverão ser realizados nos animais de forma individual, fora da gaiola e os dados devem ser registrados utilizando sistema de pontuação (OECD, 2008b; Malone & Robichaud, 1962).

Ao fim do estudo no 29º dia, todos os animais deveram ser submetidos à eutanásia. Será realizada a coleta de sangue e retirada dos órgãos para avaliação macroscópica e histopatológica. Os parâmetros bioquímicos e hematológicos devem ser realizados para avaliar os efeitos tóxicos nos tecidos (ANVISA, 2004; OECD, 2008b).

#### 2.4.4. Genotoxicidade e mutagenicidade

Os seres vivos são constantemente expostos à vários agentes físicos, biológicos e químicos que podem levar a alterações genéticas ao interagir com o material genético. Essas modificações podem ser cromossômicas ou a nível gênico, podendo alterar ou não os processos fisiológicos. No entanto, os seres vivos por apresentar um sistema de reparo de DNA, podem detectar, controlar e corrigir as modificações acometidas no código genético, garantindo a sobrevivência ou a estabilidade da célula ou organismo (FIGUEIRA, 2017).

As ações genotóxicas são aquelas que interagem com o ácido desoxirribonucleico (DNA) produzindo alterações em sua estrutura ou função, na qual poderão ser corrigidas pelo sistema de reparo do DNA. Quando essas mudanças são reparadas, portanto não permanentes, são denominadas de alterações genotóxicas. Mas, em alguns casos a reparação do DNA não é realizada, passando a ser uma alteração permanente, e são chamados de mutação, podendo ou não serem transmitidas as gerações futuras, sendo denominadas de alterações mutagênicas (CARVALHO, 2014; FIGUEIRA, 2017). Logo, todas as substâncias mutagênicas são genotóxicas, porém, nem todas as substâncias genotóxicas são mutagênicas (DE FLORA; IZZOTTI, 2007). Assim, a mutagênese é a ciência que estuda os mecanismos que induzem a essas possíveis alterações. E a genotoxicidade é a área de estudo entre a toxicologia e a genética, podendo ser chamada também de toxicogenética ou genética toxicológica (GUYTON et al., 2009).

Os agentes antimutagênicos ou antixenotóxico são todas as substâncias sintéticas ou naturais que possuem a capacidade de evitar danos ao DNA, reduzindo a frequência de mutações induzidas ou espontâneas. O mecanismo de ação dos agentes antimutagênicos podem ser de duas formas, bioantimutagênese ou desmutagênese. Na bioantimutagênese, inibem possíveis falhas do sistema de reparo onde poderão gerar erros, assim os agentes antimutagênicos modulam o reparo e replicação do DNA. Na desmutagênese, as substâncias que induzem a mutação no DNA (mutágenos), são inativadas enzimaticamente ou quimicamente por agentes protetores (desmutágenos), impedindo a ativação metabólica de sequestradores de moléculas reativas ou de pró-mutágenos (DELARMELINA, 2012; FIGUEIRA, 2017).

Para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de um agente químico, biológico ou físico, encontram-se disponíveis estudos bem estabelecidos e aceitos por comunidades científicas e agências regulatórias, como testes de micronúcleos e cometa na qual são utilizados frequentemente na determinação toxicológica de compostos químicos, medicamentoso e de plantas.

#### 2.4.4.1. Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo é um ensaio biológico que detecta os danos causados por agentes químicos em cromossomos ou no aparelho mitótico de eritroblastos, resultando na formação de um núcleo secundário pequeno, chamado de micronúcleo (MN) (CARVALHO, 2014; FIGUEIRA, 2017). Essa detecção é realizada nos eritrócitos da medula óssea ou nos eritrócitos policromáticos no sangue periférico de roedores (OECD, 1997).

Os danos causados nas células são gerados por agentes clastogênicos, responsáveis pelo rompimento do cromossomo e aneugênicos, que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal (FIGUEIRA, 2017).

O MN é uma pequena massa nuclear presente no citoplasma e delimitada por membrana separada do núcleo principal, facilmente identificável (Figura 5). Surgem em células filhas como consequência de uma reparação errônea ou de danos genéticos nas células parentais que não foram reparadas (FIGUEIRA, 2017). Os MNs são provenientes da quebra cromossômica que formam fragmentos acêntricos ou devido a danos nos cromossomos inteiros que não migram para os pólos da anáfase não sendo introduzido no núcleo recém formado na telófase (MENEQUETTI et al., 2012; FIGUEIRA, 2017).

Durante o processo de maturação celular, os eritroblastos presentes na medula têm seu núcleo expulso e passa a ser convertido em uma célula imatura, o eritrócito policromático (EPC - eritrócito jovem), que após a maturação passa a ser chamado de normocromáticos (ENC - eritrócitos maduros). Durante o processo de expulsão do núcleo principal qualquer micronúcleo (MN) formado pode permanecer no citoplasma, e pode ser visualizado microscopicamente (OECD, 1997).

A presença de um micronúcleo em um eritrócito policromático de um rato ou camundongo indica um dano produzido recentemente, onde os efeitos dos agentes químicos poderão ser observados nestas células. Este tipo de eritrócito não possui núcleo e apresenta um curto tempo de vida, sendo este ciclo de divisão em torno de 22 a 24 horas (CARVALHO, 2014; FIGUEIRA, 2017; OECD, 1997). Na figura 5 encontra-se um esfregaço de medula óssea com eritrócitos policromáticos micronucleados, eritrócitos normocromáticos, e evidenciando sua diferença na coloração entre os eritrocitários. Os eritrócitos policromáticos são células jovens (RNA positivo com presença de ribossomo) e coram-se em azul em contato com eosina azul de metileno e os eritrócitos normocromáticos que são células maduras em vermelho/rosa (RNA ausente e passa a conter hemoglobina) (DELARMELINA, 2012).

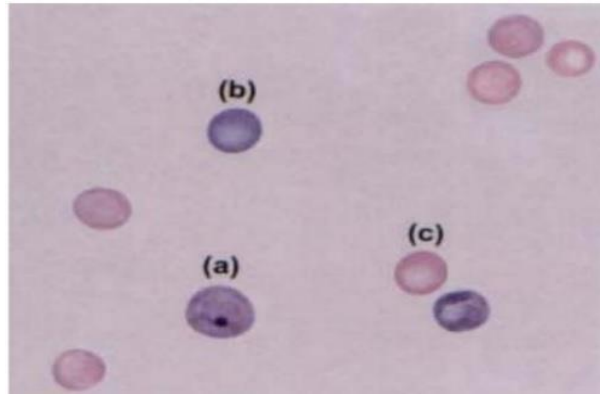


Figura 5 - Esfregaço de medula óssea. Eritrócito policromático com micronúcleo (a). Eritrócito policromático sem micronúcleo (b). Eritrócito normocromático (c). Fonte: Ribeiro,(2003).

O teste do MN foi originalmente desenvolvido na detecção de danos cromossômicos e cromatídicos em eritrócitos da medula óssea de roedores, onde posteriormente foi padronizado em sangue periférico. O ensaio é realizado preferencialmente em eritrócitos policromáticos da medula óssea e do sangue periférico, onde estão em altas e constantes taxas de divisões celulares, por serem anucleados e diferenciados em eritrócitos policromáticos na presença de RNA. Na contagem do número de MN em eritrócitos policromáticos se determina o potencial mutagênico, e a relação de eritrócitos normocromáticos/ eritrócitos policromáticos determina a citotoxicidade (CHOY, 2001; TERRAZAS, 2013).

Segundo a OECD (1997), qualquer espécie de mamífero pode ser utilizada no teste do MN, mas recomenda-se o uso de camundongos e ratos devido à praticidade e a padronização recomendada pelos órgãos vigentes. Os animais deverão ser divididos entre grupos de controle positivo, negativo e teste, como no mínimo cinco animais de cada sexo. Os animais expostos as suas respectivas substâncias, têm-se amostras do sangue periférico coletadas pelo menos duas vezes para realizar os esfregaços e a coloração das lâminas (OECD, 1997).

O teste do micronúcleo *in vivo* realizado a partir de células da medula óssea e sangue periférico de roedores é amplamente aceito pelas agências governamentais e internacionais fazendo parte dos estudos da determinação de segurança de produtos químicos e farmacêuticos (KRISHNA et al., 2000).

O ensaio *in vitro* do micronúcleo, normalmente utiliza culturas de células humanas ou células de roedores no monitoramento dos danos clastogênicos e aneugênicos em células que passam pela divisão celular após ou durante a exposição à substância teste. No entanto, geralmente solicitam um sistema exógeno para ativação metabólica para averiguação do agravo mutagênico (BARBOSA, 2014; KRISHNA; HAYASHI, 2000).



#### 2.4.4.2. Teste de Cometa – *Single Cell Gel Electrophoresis* (SCGE)

O ensaio do cometa, também chamado como corrida de células únicas em gel de eletroforese (SCGE) detecta o potencial genotóxico de substâncias sintéticas e naturais sobre organismos vivos, revelando possíveis danos primários no DNA. Foi introduzida pela primeira vez em 1984 por Östling e Johanson com o objetivo de buscar os possíveis danos sofridos no DNA de fita dupla em corrida de eletroforese sob pH neutro. Posteriormente em 1988, a metodologia do ensaio cometa foi adaptada por Singh e colaboradores onde passou a ser utilizado em tampão com pH superior a 13, possibilitando detectar os danos em fita dupla e em fita simples (FIGUEIRA, 2017; OSTLING; JOHANSON, 1984; SINGH; MCCOY; TICE; SCHNEIDER, 1988).

Independentemente do método utilizado, o procedimento do teste é fundamentado na eletroforese de células em lise embebidas no gel de agarose, fazendo com que os fragmentos (danos cometidos no DNA) se afastem do seu núcleo principal, resultando em uma imagem com formato semelhante a um cometa, de onde surgiu o nome do teste (KLAUDE; ERIKSSON; NYGREN, AHNSTRÖM, 1996). A Figura 6 demonstra a estrutura de um cometa com a cabeça e cauda.



Figura 6. Estrutura de um cometa com cabeça e cauda. Fonte: Gontijo; Tice (2003).

O teste cometa é uma metodologia que não detecta mutações, mas sim lesões genômicas, que após serem processadas podem se tornar mutações quando não corrigidas. Ao contrário das mutações, as lesões encontradas no ensaio do cometa são susceptíveis de correção, o que torna o teste de cometa apto para análises de reparação do DNA (RIBEIRO, SALVADORI; MARQUES, 2003; SOUZA, 2011).

Como o metabolismo celular pode ter em torno de 1000 lesões diárias no DNA em condições normais, não existe célula sem danos, sendo então um tipo de teste comparativo,

logo se faz necessário a presença de controles negativos e positivos para os experimentos (RIBEIRO et al., 2003; SOUZA, 2011).

O teste de cometa é um modelo que não necessita de células em proliferação para sua viabilidade, o que difere de testes como aberrações cromossômicas, micronúcleo e trocas de cromátides irmãs, que necessitam de tais condições (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1999).

No ensaio de cometa, células são depositadas em lâminas contendo agarose e embebidas em uma solução de lise, resultando na dissolução das membranas nucleares e facilitando a difusão do material celular durante a corrida de eletroforese. Logo, células com o DNA (carga negativa) fragmentado e solto, ao serem submetidas a uma corrida em gel de eletroforese migram rumo ao polo positivo, ficando distante do principal núcleo, formando uma cabeça (região nuclear), e cauda (fragmentos de DNA). Para análise das lâminas, as mesmas são coradas com fluorescentes como iodeto de propídio, brometo de etídio e *Syber Green* e visualizadas em microscopia de fluorescência, como também coradas com Giemsa ou nitrato de prata e analisados em microscopia óptica (FIGUEIRA, 2017; SANTOS, 2015). Para interpretação dos resultados, são visualizados e classificados os diferentes danos ao DNA nas células (figura 7).

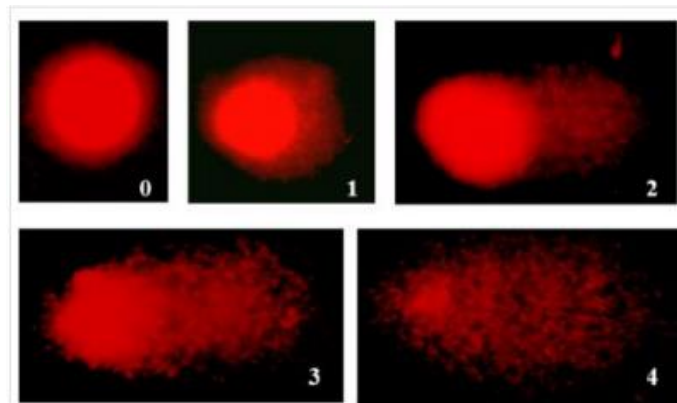


Figura 7. Diferentes danos ao DNA, com as 5 categorias que indicam o grau de lesão sofrido pelas células. Onde: 0= sem dano (< 5%); 1= baixo nível de dano (5-20%); 2= médio nível de dano; 3= alto nível de dano (40-95%); 4=dano total (95%). Fonte: Adaptado de Singh et al., (1988).

#### 2.4.4.3. Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somática (SMART)

O teste de SMART (do inglês, *Somatic mutation and recombination test*) detecta a perda de heterozigidade (LOH), identificados nas asas de *D. melanogaster* resultante de anormalidades genéticas como mutação, deleção e recombinação. O teste tem como base o desenvolvimento embrionário de *D. melanogaster*, que em casos de alteração genética,

provoca mudanças nas células dos discos imaginais da asa da mosca e um clone de célula mutante é formado, diferenciando-se em estruturas observada na mosca adulta que pode ser detectado como uma mancha na superfície do corpo (GRAF, 1995).

Para a determinação da expressão fenotípica dos genes mutantes é realizado uma análise dos marcadores *mwh* (do inglês, *multiple wing hairs*), que forma tricomas múltiplos por célula ao invés de tricomas únicos normais, e *flr* (do inglês, *flare*) que altera o formato dos pêlos da asa produzindo pêlos com aparência de chama, permitindo a caracterização da LOH resultante da genotoxicidade.

No presente estudo, o teste de SMART foi reproduzido após o cruzamento entre três linhagens mutantes de *D. melanogaster* portadoras dos marcadores genéticos, o *mwh*, que possui manifestação fenotípica caracterizada por três ou mais pêlos na asa, o *ORR/flr<sup>3</sup>*, que possui pelos simples e o *flr* onde a manifestação fenotípica se caracteriza por pêlos em forma de chama. Com as linhagens formadas, dois cruzamentos são realizados, sendo um cruzamento padrão ST (do inglês, *ST-standard cross*) entre machos *mwh* e fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>* (GRAF *et al.*, 1984); e o cruzamento de alta bioativação HB (do inglês, *HB-high bioactivation cross*) entre machos *mwh* e fêmeas virgens *ORR/flr<sup>3</sup>* (GRAF; VAN SCHAIK, 1992). Posteriormente ao cruzamento, ovos são coletados dentro de 8 horas em frascos de cultura com uma base sólida de ágar-ágar e uma camada de fermento biológico (*Saccharomyces cerevisiae*) suplementada com sacarose. Após 3 dias de crescimento, as larvas atingem o 3º estágio de desenvolvimento e são lavadas nos frascos com água corrente e coletadas com o auxílio de uma peneira. Estas larvas derivadas do cruzamento HB e ST podem ser tratadas agudamente (1 a 6 horas) ou cronicamente (1 a 4 dias) por administração via inalatória ou oral com o composto desejado. Em um tratamento crônico, as larvas são colocadas em frascos com meio instantâneo para *Drosophila* ou em um meio de cultura alternativo (purê de batata), contendo o composto testado. Após a eclosão, as moscas são retiradas dos frascos de exposição e fixadas em etanol 70%.

As asas são destacadas e montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure, e são analisadas quanto á ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400X.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 GERAL

Avaliar o perfil toxicológico, genotóxico e mutagênico do óleo da semente de *Pachira aquatica* Aublet.

#### 3.2 ESPECÍFICOS

Caracterizar o perfil de ácidos graxos do óleo da semente de *Pachira aquatica* Aublet.

Estimar a DL<sub>50</sub> do óleo da semente de *Pachira aquatica* através do modelo de toxicidade aguda.

Avaliar os efeitos toxicológicos sistêmicos da administração do óleo da semente de *Pachira aquatica* através do modelo de toxicidade oral por doses repetidas por 28 dias (toxicidade a curto prazo);

Analisar o efeito dos animais tratados com o óleo da semente de *Pachira aquatica* sobre parâmetros comportamentais, bioquímicos, hematológicos e histopatológicos.

Avaliar efeitos genotóxicos, mutagênicos e citotóxicos do óleo da semente de *Pachira aquatica* através de testes em ratos *Wistar* e do teste para detecção de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*.

#### 4 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

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

ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Resolução – RDC Nº 48. Diário Oficial da União. Brasília, 16 de março de 2004.

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

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

ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Dispõe sobre os critérios para classificação toxicológica de agrotóxicos, componentes, afins e preservativos de madeira e para comparação da ação tóxica de agrotóxicos e afins no âmbito da Anvisa. Brasília, 10 de outubro de 2016

ANDRADE-CETTO, A.; HEINRICH, M. Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. **J Ethnopharmacol**, v.99, p. 325-348, 2005.

AMENI, A. Z. Avaliação dos possíveis efeitos tóxicos do extrato fluido de *Casearia sylvestris*, em ratos Wistar. **Dissertação de Mestrado**. Universidade de São Paulo, 2011.

APG II. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. **Botanical Journal of the Linnean Society**, v. 141, p. 399-436, 2003.

BAILEY, A. E. Industrial oil and fat products. Adverse Effects of Same Natural Constituents in Fats and Oils: Interscience Publishers, Inc.; New York. v. 6, 1996.

BALBINOT, N. S.; SCHNEIDER, R. D. C. D. S.; RODRIGUEZ, A. D. A. L.; KAPPEL, F. I.; PREDIGER, M. H.; LARA, L. R. S. Aproveitamento dos resíduos da produção de oleaginosas e da extração de óleo. Asociación Interamericana de Ingeniería Sanitaria y Ambiental. Sección Uruguay. Rescatando antiguos principios para los nuevos desafíos del milenio. Montevideo, AIDIS, p.1-6, 2006.

BARBOSA, B. F. F. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do fruto da palmeira juçara (*Euterpe Edulis Martius*) em ratos Wistar. **Dissertação de Mestrado**. Faculdade de ciências farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2014.

BAYER, C.; KUBITZKI, K. Malvaceae. In *The Families and Genera of Vascular Plants Flowering Plants. Dicotyledons*, v. 5, p. 225-311, 2003.

BERRY, S. K. Cyclopropene fatty acids in some Malaysian edible seeds and nuts: I. Durian (*Durio zibethinus*, Murr.). *Lipids*, v. 15, p. 452-455, 1980.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimentos e ou Novos Ingredientes. Brasília, 1999a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 17, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos. Brasília, 1999b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. Brasília, 1999c.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para Registro de Alimento com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde em sua Rotulagem. Brasília, 1999d.

BRUM, M.C.; SANTOS, L.S.; SANTOS, R.B.; LACERDA JUNIOR, V.; GRECO, S.J.; CASTRO, E.V.R. Biodiesel da munguba (*Pachira aquatica* Aubl.): síntese e avaliação da presença de ácidos graxos ciclopropenoídicos. **32ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química - SBQ**, Fortaleza, 2009.

BUCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J.A. Avaliação da mutagênese e genotoxicidade em *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) expostos ao benzeno. **Acta Amazonica**, Manaus, v.36, n.3, p.357-364, 2006.

CAMARGO, M. F. Caracterização química do óleo extraído da *Pachira aquatica* Aubl. **Revista Tchê Química**, v. 4, p. 19-22, 2008.

CARVALHO, W. F. Avaliação de danos genéticos e correlação com polimorfismos nos genes *gstml* e *gstt1* em trabalhadores ocupacionalmente expostos a agrotóxicos em municípios goianos com intensa atividade agrícola. **Dissertação de Mestrado**. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2014.

CHAVES, M. H.; BARBOSA, A. S.; NETO, J. M. M.; AUED-PIMENTEL, S.; LAGO, J. H. G. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud. **Revista Química Nova**, v.27, p. 404-408, 2004.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. *Genetic toxicology and cancer risk assessment*, p. 93-113, 2001.

CORDEIRO, L. A. M. Avaliação de características agrônômicas e qualidade de sementes de canola (*Brassica napus* L. var. oleifera) cultivada em Viçosa-MG. Universidade Federal de Viçosa, 1997.

CORRÊA, M. P. Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas Dicionário de plantas úteis do Brasil e das exóticas cultivadas: Imprensa Nacional Brasília, 1984.

CHRISTOFF, P. Produção de biodiesel a partir do óleo residual de fritura comercial. Estudo de caso: Guaratuba, litoral paranaense. Dissertação em desenvolvimento de tecnologia. Instituto de Engenharia do Paraná, 2006.

CRONQUIST, A. An integrated system of classification of flowering plants: Columbia University Press, 1981.

CRUZ, E. D.; CARVALHO, J. E. U. Biometria de frutos e sementes e germinação de curupixá (*Micropholis cf. venulosa* Mart. & *Eichler-Sapotaceae*). Embrapa Amazônia Oriental-Artigo em periódico indexado, 2003.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A. Mutagenesis and cardiovascular diseases. Molecular mechanisms, risk factors, and protective factors. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 621, n. 1–2, p. 5–17, 2007.

DELARMELINA, J. M. Avaliação da ação antimutagênica da Ipriflavona contra os danos induzidos por ciclofosfamida. **Dissertação de Mestrado**. Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2012.

DUARTE, M. Análise filogenética de *Eriotheca* Schott & Endl. e gêneros afins (Bombacoideae, Malvaceae) e estudo taxonômico de *Eriotheca* no Brasil. **Dissertação**. São Paulo: Instituto de Botânica de São Paulo, 2010.

EMBRAPA, Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. História da Soja. Disponível em:< <https://www.embrapa.br/soja/cultivos/soja1/historia>> Acessado 16 de março de 2017

FAEGRI, K.; VAN DER PIJL. The Principles of Pollination Ecology: Pergamon Press, London and New York. **Elsevier**, 1979.

FEUGE, R.; CODIFER, L.; ZERINGUE, H. Improved procedure for titrating cyclopropene esters with hydrogen bromide. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 58, p. 718-722, 1981.

FIGUEIRA, A. C. G. Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica e mutagênica/antimutagênica do óleo essencial da *Lantana camara* (cambará). **Dissertação de Mestrado**. Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2017.

FREITAS, L. S.; JACQUES, R. A.; RICHTER, M. F.; SILVA, A. L.; CARAMÃO, E. B. Pressurized liquid extraction of vitamin E from Brazilian grape seed oil. **Journal of Chromatography A**, v. 1200, p. 80-83, 2008.

FREITAS, S. M.; BARBOSA, M. Z.; FRANCA, T. J. Cadeia de produção de soja no Brasil: o caso do óleo. *Informações economicas-governo do estado de São Paulo instituto de economia agrícola*, v.30, p. 30-41, 2000.

GONTIJO, A.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. **Mutagênese ambiental. Canoas**: Ulbra, p. 173-200, 2003.

GRAF, U.; WÜRGLER, F. E.; KATZ, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B. & KALE, P. G. Somatic Mutation and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Environmental Mutagenesis**, v. 6, p. 153–188, 1984.

GRAF, U.; VAN SCHAİK, N. Improved high bioactivation cross for the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, v. 271, n. 1, p. 59–67, 1992.

GRAF, U. Analysis of the relationship between age of larvae at mutagen treatment and frequency and size of spots in the wing somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Experientia**, v. 51, n. 2, p. 168–173, 1995.

GUNSTONE, F. D. Production and trade of vegetable oils. **Vegetable Oils in Food Technology: Composition, Properties and uses**, 2 ed., p. 1-24, 2011.

GUYTON, K. Z.; KYLE, A. D.; AUBRECHT, J.; COGLIANO, V. J.; EASTMOND, D. A.; JACKSON, M.; ZHANG, L. Improving prediction of chemical carcinogenicity by considering multiple mechanisms and applying toxicogenomic approaches. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, p. 230-240, 2009.

JORGE, N.; LUZIA, D. M. M. Caracterização do óleo das sementes de *Pachira aquatica* Aublet para aproveitamento alimentar. **Acta Amazonica**, v. 42, p. 149-156, 2012.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 363, p. 89-96, 1996.

KRISHNA, G., & HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, p. 155-166, 2000.

KURAM, E.; OZCELIK, B.; HUSEYIN-CETIN, M.; DEMIRBAS, E.; ASKIN, S. Effects of blended vegetable- based cutting fluids with extreme pressure on tool wear and force components in turning of Al 7075- T6. **Lubrication Science**, v. 25, p. 39-52, 2013.

LAJOLO, F. M.; MARQUEZ, U. M. L.; FILISETTI-COZZI, T. M.; MCGREGOR, D. I. Chemical composition and toxic compounds in rapeseed (*Brassica napus*, L.) cultivars grown in Brazil. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 39, p. 1933-1937, 1991.

LAPA, A.; SOUCCAR, C.; LIMA-LANDMAN, M.; GODINHO, R.; LIMA, T. Farmacologia e toxicologia de produtos naturais. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. Florianópolis: Editora da Universidade Federal de Santa Catarina, p. 181-196, v.1999.



LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa**: Editora Plantarum, p. 352, 1992.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa**, Brazil: Instituto Plantarum de Estudos da Flora Ltda. p. 352, 1998.

LORENZI, H. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas: de consumo in natura: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2006.

LORENZI, H.; BACHER, L.; LACERDA, M.; SARTORIS. Frutas brasileiras e exóticas cultivadas (de consumo in natura). São Paulo: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, p. 382-386, 2006.

MANDARINO, J. M. G.; ROESSING, A. C.; BENASSI, V. T. Óleos: alimentos funcionais. Londrina: **Embrapa Soja**, p. 14-21, 2005.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; ZAN, R.A.; RAMOS, L.J. Adaptation of the micronucleus technique in *Allium cepa*, for mutagenicity analysis of the Jamari river valley, western Amazon, Brazil. **Journal of Environment Analytic Toxicol**, v. 2, 2012.

MORAIS, A. A. C. D.; SILVA, A. L. D. Valor nutritivo e funcional da soja. **Rev. bras. nutr. clín**, v. 15, p. 306-315, 2000.

MOREIRA, B. O.; PAULA, V. F. D.; MARTINS, D.; NOBRE, G. A.; NETA, L. C. D. S. Atividade antimicrobiana de naftoquinonas isoladas de *Pachira aquatica*. 25<sup>a</sup> Reunião Anua, **Sociedade Brasileira de Química– SBQ**, 2002.

MOURAD, A. L. Principais culturas para obtenção de óleos vegetais combustíveis no Brasil. An.6. **Enco Energia**. Meio Rural, 2006.

OECD, Guideline for Testing of Chemicals. No 401: Acute Oral Toxicity. Paris Organisation for Economic Co-operation and Development, 1987. Disponível em: <[http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-401-acute-oral-toxicity\\_9789264040113](http://www.oecd-ilibrary.org/environment/test-no-401-acute-oral-toxicity_9789264040113) en;jsessionid=1c4h6pdgxaolt.x-oecd-live-03>

OECD, Organization for economic cooperation and development. Guidelines for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity – Fixed Dose Procedure. Paris: OECD, 2001a, Guideline 420, 2001a.

OECD, Organization for economic cooperation and development. Guidelines for the testing of chemicals: Acute Oral Toxicity-Acute Toxic Class Method. Paris: OECD, Guideline 423, 2001b.

OECD, Guidelines for testing of chemical. Acute oral toxicity – up-and-down procedure. OECD (Ed.): Paris, 2008a

OECD, Guidelines for testing of chemical. Repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. OECD (Ed.): Paris, 2008b

- OLIVEIRA, J.; VASCONCELOS, I.; BEZERRA, L.; SILVEIRA, S.; MONTEIRO, A.; MOREIRA, R. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* St Hil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. **Food Chemistry**, v. 70, p. 185-191, 2000.
- OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 123, p. 291-298, 1984.
- PAULA, V. F.; BARBOSA, L. C.; DEMUNER, A. J.; PILÓ-VELOSO, D. A química da família Bombacaceae. **Quim. Nova**, v. 6, p. 627-630, 1997.
- PEIXOTO, A. L.; ESCUDEIRO, A. *Pachira aquatica* (Bombacaceae) na obra “História dos Animais e Árvores do Maranhão” de Frei Cristóvão de Lisboa. **Rodriguésia**, v. 53, p. 123-130, 2002.
- PEREIRA, C.; VIDAL, C.; QUIRINO, M.; PAULO, M. Avaliação da atividade toxicológica e microbiológica do extrato hidroalcolólico da resina de *Pachira aquatica* (Bombacaceae). Anais, Encontro de Iniciação Científica da Universidade Federal da Paraíba, v.10, p. 19, 2002.
- POLIZELLI, P. P.; FACCHINI, F. D.; CABRAL, H.; BONILLA-RODRIGUEZ, G. O. A new lipase isolated from oleaginous seeds from *Pachira aquatica* (Bombacaceae). **Appl Biochem Biotechnol**, v. 150, p. 233-242, 2008.
- RANK, J.; LOPEZ, L.C.; NIELSEN, M.H.; MORETTON, J. Genotoxicity of maleic hydrazide, acridine and DEHP in *Allium cepa* root cells performed by two different laboratories. **Hereditas**, Lund, v.136, p.13-18, 2002.
- RAO, K. S.; JONES, G. P.; RIVETT, D. E.; TUCKER, D. J. Cyclopropene fatty acids of six seed oils from Malvaceae. **Journal of the American Oil Chemists Society**, v. 66, p. 360-361. 1989.
- RIBEIRO, L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. **Mutagênese Ambiental**. ULBRA, Canoas, p. 173-178, 2003.
- RIBEIRO, L. R., SALVADORI, D. M. F., & MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ed.ULBRA, 2003.
- ROJAS, E.; LOPEZ, M.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of Chromatography B: Biomedical Sciences and Applications**, v. 722, p. 225-254, 1999.
- SANTOS, N. C. N. D. Avaliação da genotoxicidade e da citotoxicidade de produtos utilizados na terapia pulpá de dentes decíduos com o uso do teste de micronúcleo em medula óssea de camundongos e do ensaio cometa em linfócitos humanos. **Tese de Doutorado**, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana 2015.
- SANTOS, R.; GAGLIARDI, A.; XAVIER, H.; MAGNONI, C.; CASSANI, R.; LOTTENBERG, A.; ALVES, R. I Diretriz sobre o consumo de gorduras e saúde cardiovascular. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, v. 100, p. 1-40, 2013.

SARTORI, S.; BACHER, L.; LACERDA, M. Frutas Brasileiras e Exóticas cultivadas (de consumo in natura): São Paulo: Instituto Plantarum de Estudos da Flora LTDA, 2006.

SHIBATANI, M.; HASHIDOKO, Y.; TAHARA, S. A major fungitoxin from *Pachira aquatica* and its accumulation in outer bark. **Journal of chemical ecology**, v. 25, p. 347-353, 1999.

SILVA, T. G. Potencial Nutricional das Amêndoas de *Pachira aquática* Aubl. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal da Grande Dourados: Mato grosso do Sul, 2015.

SILVA, A. M. M. D.; AMARAL, A. E. G. D.; BRAGA, E. V. S. D. C.; SOUSA, P. H. M. D.; FIGUEIREDO, R. W. Compostos bioativos nas amêndoas de monguba. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, p. 3615-3620, 2015a.

SILVA, A.; AMARAL, A.; BRAGA, E.; SOUSA. Propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da munguba (*Pachira aquatica* Aubl.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 37, p. 193-200, 2015b.

SILVA, B. Análise físico-química lipídica e morfologia das amêndoas das sementes da munguba (*Pachira aquatica* aubl.). **Revista UNI-Imperatriz (MA)**, v. 1, p. 63-74, 2011.

SILVA, E. R. D.; 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, p. 273-280, 2012.

SILVA, K. B.; ALVES, E. U.; MATOS, V. P.; LUCENA B. A. R. Caracterização morfológica de frutos, sementes e fases da germinação de *Pachira aquatica* Aubl. (Bombacaceae). Semina: **Ciências Agrárias**, v. 33, 2012.

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

SOUZA, D. K.; ABREU LIMA, R.; DOMINGUES, C. A.; PEDROSO, L. A.; FACUNDO, V. A.; GAMA, F. C.; ALVES, M. R. Potencial fungicida do extrato etanólico obtido das sementes de *Pachira aquática* AUBL. sobre *Fusarium* sp. **Ciência e Natura**, v. 36, 2014.

SOUZA, D. R. D. Aplicabilidade de reações de Fenton e foto-Fenton no tratamento de glifosato comercial. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia 2011.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H.; FLORA, I. P. D. E. D. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil em APG II: **Instituto Plantarum de Estudos da Flora**, 2008.

TERRAZAS, P. M. Estudo do potencial genotóxico da Gutiferona A em diferentes células de camundongos in vitro. **Dissertação de Mestrado**, Universidade Estadual Paulista de Botucatu, São Paulo, 2013.

TOMM, G. Canola: planta que traz muitos benefícios à saúde humana e cresce em importância no Brasil e no mundo. **A lavoura**, p. 46-47, 2007.

TUROLLA, M. S. R.; NASCIMENTO, E. S. Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p. 289-306, 2006.

VALADARES, M. C. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, p. 93-98, 2006.

VIEIRA, S. A. P. B. Avaliação do Potencial Antiofídico e genotóxico da isohemigossipolona, uma naftoquinona isolada da *Pachira aquática* (Aubl.). **Dissertação de Mestrado**, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2010.

WATERLOW, J. C. Fats and fatty acids in human nutrition. Report of an expert consultation. **Food and agriculture organization of the united nations**. Rome, 2010.

KWAK, N.; JUKES, D. J. Functional foods. Part 1: the development of a regulatory concept. **Food Control**. v. 12, p. 99-107, 2001.

## 5 APÊNDICES

### **5.1 Artigo I: Revista Food and Chemical Toxicology (Qualis A2)**

Submetido ao periódico “*Food and Chemical Toxicology*” (Fator de Impacto 3,778, Qualis A2 na área Medicina II). Data da Submissão: 10/08/2018

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

**ACUTE AND SHORT-TERM TOXICITY IN RATS ORALLY TREATED WITH  
*PACHIRA AQUATICA* AUBLET SEED OIL**

Jhony Moreira Marcelino<sup>a\*</sup>, Luis Henrique Almeida Castro<sup>a</sup>, Ariany Carvalho dos Santos<sup>a</sup>, Roosevelt Isaias Carvalho Souza<sup>a</sup>, Giseli Karenina Traesel<sup>a</sup>, Gustavo Roberto Villas Boas<sup>b</sup>, Eliana Janet Sanjinez-Argandoña<sup>c</sup>, Luis Fernando Benitez Macorini<sup>d</sup>, Silvia Aparecida Oesterreich<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> *Faculty of Health Sciences, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.*

<sup>b</sup> *Center of Biological Sciences and Health, Federal University of the West of Bahia, Barreiras, Bahia, Brazil.*

<sup>c</sup> *Faculty of Exact Sciences and Technology, Federal University of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.*

<sup>d</sup> *University Center of Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brazil.*

\* **Corresponding author.** Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados. Rodovia Dourados - Itahum, Km 12. Caixa Postal - 533. CEP: 79.804-970. Dourados, MS, Brasil. Telefone: + 55 67 999994979. E-mail: [jhony.moreira@hotmail.com.br](mailto:jhony.moreira@hotmail.com.br)

## <sup>1</sup> Abbreviations

---

<sup>1</sup>ALT: alanine aminotransferase; ANOVA: analysis of variance; AST: aspartate aminotransferase; FID: flame ionization detector; HDL: high density lipoprotein; LD<sub>50</sub>: lethal dose; MCH: mean corpuscular hemoglobin; MCHC: mean corpuscular hemoglobin concentration; MCV: mean corpuscular volume; OSPA: oil extracted from *Pachira aquatica* Aublet seeds; RDW: Red cell distribution width; SEM: standard error of the mean; UFGD: Federal University of Grande Dourados.



## Abstract

*Pachira aquatica* Aublet, popularly known as "munguba" is a leafy tree that produces fruits with seeds appreciated by the South American population, who consume them in the cooked, roasted or toasted form or as flour. The aim of this study was to analyze the toxicological profile of the oil extracted from *P. aquatica* (OSPA) seeds through acute and short-term toxicity tests performed on female and male Wistar rats. For the acute toxicity test, five females received single dose of 2000 mg / kg body weight of OSPA by gavage and were observed for 14 days. In short-term toxicity, female and male rats received repeated doses of 250, 500 and 1000 mg / kg / weight of OSPA for 28 days. In both trials, no deaths or behavioral changes were observed, suggesting that the LD<sup>50</sup> is greater than 2000 mg / kg / body weight. Changes in the weight of some organs and in the biochemical results did not correspond to the histopathological and hematological analysis. Thus, the results indicate low acute and short-term toxicity following oral OSPA exposure in rats under the experimental conditions applied. However, additional assessments with subchronic, chronic, toxicokinetic or toxicodynamic toxicity studies are needed to clarify through which routes OSPA is absorbed, distributed, metabolized and excreted, emphasizing in case of toxic effect which target organs and by what mechanism it occurred, so that clinical studies can be carried out with humans and ensure the safety of this plant for human consumption and ethnopharmacological use.

**Keywords:** Safety; Acute toxicity; Repeated doses; LD<sub>50</sub>; Preclinical studies; *Pachira aquatica* Aublet.

## Highlights:

\* *Pachira aquatica* Aublet seed oil is safe when administered at high concentrations in rats.

## 1. Introduction

The growing emergence of chronic degenerative diseases is a public health problem that has affected the quality of life of the population and has attracted the attention of public health agencies that evaluate the safety conditions during the consumption of certain foods (Moraes and Colla, 2006). In this context, studies with functional foods and nutraceuticals aimed at promoting health and prioritizing quality, speed and low cost have been highlighted due to the reduction of health risks caused by chronic diseases and increase in life expectancy (Moraes and Colla, 2006; Konan et al., 2007).

*Pachira aquatica* Aublet is a fruit species native to the Americas, which can be found in regions of high humidity, riparian forests and as an ornamental plant in several urban areas of Brazil (Peixoto and Escudeiro, 2002). It belongs to the Malvaceae family, popularly known as *munguba*, *mongubeira*, *castanheira*, *castanha da Guiana* and *cacau falso* (Souza and Lorenzi, 2008; Lorencon et al., 2016).

The plant annually produces large amounts of fruits with edible seeds (nuts or almonds), with high percentage of proteins (12.9%) and fibers for daily ingestion and large amounts of oil (53.9%), with palmitic acid being predominant among saturated fatty acids (Oliveira et al., 2000). The oil has physicochemical characteristics such as saponification, melting point and fatty acids profile similar to other oils such as peanuts and palm, and due to such similarities, may be favorable to human consumption and industrial use (Oliveira et al., 2000; Silva et al., 2010; Jorge and Luzia, 2012).

As plants and functional foods are not free from toxic effects, there is a need for research investigating the toxicity profile, ensuring safety and efficacy in the use of substances added to food and used as raw material in cosmetic and pharmaceutical industries (Calixto, 2000). Thus, the aim of this study was to evaluate the preclinical safety profile of oil extracted from *P. aquatica* seeds (OSPA) in experimental models of acute

and short - term toxicity. This information may contribute to the safe use of this species in human nutrition to support phase 1 clinical trials.

## **2. Material and Methods**

### ***2.1. Plant collection and identification***

*P. aquatica* fruits were collected in the municipality of Dourados - Mato Grosso do Sul (latitude 22°14'25.869 " , longitude 54°47'23.153 " and 450 m a.s.l.) on March 2017, according to authorization issued by the Brazilian Environmental Agency (no.55046-1 and MMA / ICMBio / SISBIO). The specimen was identified by Dr. Zefa Valdivina Pereira and deposited in the plant collection facility of the Federal University of Grande Dourados (UFGD) under number 5.407.

### ***2.2. Oil preparation***

Fruits that were in the final maturation stage were selected, when spontaneous rupture of the pericarp occurs. Seeds (almonds) were removed from the fruit, sanitized in 0.66% sodium dichloroisocyanate dihydrate solution (active chlorine content of 3%) for 10 minutes and rinsed under running water. Then, the external shell (exocarp) was removed from seeds and the endosperm was dehydrated at 45 ° C for 48 hours in an air circulation oven, cooled to room temperature and submitted to extraction using an 'expeller type' cold press. The extracted oil was centrifuged at 15,000 rpm for 15 minutes and transferred to amber containers and stored under refrigeration (-7 ° C) until use.

### ***2.3. Transesterification and determination of fatty acid values***

For transesterification, 100 mg of OSPA were weighed and 2 ml of n-heptane and 2 mol / L KOH were added. The mixture was stirred for 5 minutes and after phase

separation, 1 mL of the upper layer (heptane and fatty acid methyl esters) was transferred to 1.5 mL eppendorf flasks for reading.

Fatty acid esters were analyzed by gas chromatograph (Focus GC Thermo Fisher Scientific), with Restek RT 2560 fused silica capillary column (100.0 mm in length, 0.25 mm in internal diameter and 0.20  $\mu\text{m}$ ) and a flame ionization detector (FID). Hydrogen was used as carrier gas at flow rate of 2.0 mL per minute and the makeup gases used to maintain the detector flame were nitrogen (30 mL per minute), hydrogen (30 mL per minute) and synthetic air (300 mL per minute). The injection volume was 1.0  $\mu\text{L}$  with 1:10 split. Fatty acid identification was performed by comparing the retention time of methyl ester standards (Sigma - F.A.M.E. Mix C4-C24) with samples and quantification was performed by the standardization technique using the peak area.

#### **2.4. Animals**

Wistar rats (*Rattus norvegicus albinus*) were used, 40 females and 30 males, between 8 and 10 weeks of age, with mean weight of 118-155g, coming from the animal facility of the Federal University of Grande Dourados (UFGD). Animals were housed in polypropylene cages (5 animals each) in the familiarization and experimentation period under standard conditions ( $23 \pm 2$  °C, 50 to 60% humidity and 12-h light / dark cycle controlled by automatic timer) with water and feed *ad libitum*.

The study was approved by the Ethics Research Committee on Animal Experimentation (CEUA) of UFGD under protocol 38 / 2016, respecting guidelines for laboratory animal care and ethical considerations.

## **2.5. Toxicity studies**

Acute and short-term toxicity tests were conducted on the basis of OECD protocols (Organization for Economic Cooperation and Development) - Guidelines 425 and 407 (OECD 2008a, OECD 2008b).

### *2.5.1. Acute toxicity*

To evaluate acute toxicity, 10 female Wistar rats were divided into two experimental groups (n = 5), one test group (treated with OSPA) and one negative control group (treated with corn oil). In the test group, one female rat received single dose of 2000 mg / kg OSPA by gavage dissolved in corn oil (vehicle) under an 8-hour fasting period (OECD 2008a). Continuously after 48 hours of treatment and observing the absence of death, the same dose was administered in four more females, completing the test group with five treated animals. For the formation of the negative control group, five female rats received corn oil (1 mL / kg) for comparison between groups (OECD 2008a).

Soon after OSPA administration, animals were thoroughly evaluated for clinical signs of toxicity and health through the screening parameters suggested by Malone and Robichaud (1962) after 15 min, 30 min, 2, 4, 8 and 24 hours. From the second day onwards, animals were observed once a day for 14 days. The parameters analyzed were: conscious state, reflexes, coordination of the motor system, action on muscle tone and activities on central and autonomic nervous system. In addition, daily consumption of water, food and body weight of each animal were also recorded (OECD 2008a).

After 14 days of observation, animals were weighted and anesthetized by inhalation with isoflurane, submitted to euthanasia by exsanguination, and organs (liver, kidney, spleen, heart, lung, ovary and uterus) were removed, weighed and collected to be macroscopically evaluated.

### 2.5.2. Short-term toxicity

For short-term toxicity assessment, female and male Wistar rats were weighed and distributed in six experimental groups (n = 10 animals / group, 5 males and 5 females), so-called: G1 (250 mg / kg body weight), G2 (500 mg / kg / body weight), G3 (1000 mg / kg / body weight), orally treated for 28 days; CN (negative control) orally treated with corn oil (vehicle) for 28 days; CNS (negative satellite control) receiving corn oil (vehicle) orally for 28 days and kept under observation for no more than 14 days; and GS (satellite group), who received maximum OSPA dose of 1000 mg / kg / body weight for 28 days and remained on observation without further administration for another 14 days in order to assess persistence, reversibility or onset of a possible toxic effect related to the analysis substance (OECD 2008b).

During the treatment each animal, water and feed consumption and body weight were individually evaluated and daily recorded. In the final period of tests, animals were anesthetized via inhalation (isoflurane) and submitted to euthanasia by exsanguination. Blood samples were collected by cardiac puncture for biochemical and hematological tests.

Biochemical parameters such as total cholesterol, triglycerides, glucose, hepatic (alanine aminotransferase - ALT, aspartate aminotransferase - AST) and renal function markers (urea, creatinine and uric acid) and electrolytes (sodium and potassium) were analyzed by the Cobas C111 device with Roche commercial kits.

Hematologic analyses, including complete and differential counts of leukocytes, erythrocytes, hemoglobin levels, hematocrit, hematimetric indexes, platelets and amplitude of red cell distribution were evaluated by the Sysmex KX-21N equipment. After automated analysis, slides were prepared to confirm the results obtained.

Organs (liver, kidney, spleen, heart, lung, uterus, ovary, testis and epididymis) and the brain of one animal per group were removed, weighed, and referred for histopathological

processing. The sections of each organ were fixed in 10% buffered formalin for 24 hours. Subsequent to fixation, the organ fragments were cleaved, dehydrated in absolute ethanol, diaffinized in xylene, embedded in paraffin and cut to 5  $\mu\text{m}$  thickness. Sections were stained with hematoxylin-eosin (H & E), and observed under light microscopy (Martey et al., 2010).

### **2.6. Statistical analysis**

Results were expressed as mean  $\pm$  standard error of the mean (SEM). For the acute toxicity test, Student's t-test was used to compare groups. The differences between the subchronic toxicity test groups were determined by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by the Dunnett's test. Significance level of  $p < 0.05$  was adopted. Analyses were performed using the GraphPad Prism software version 5.03 for Windows.

## **3. Results and discussion**

In South America, there are reports that *Pachira aquatica* seeds are consumed by the population because they have good palatability (Camargo, 2007). Thus, when assessing chemical composition of seeds through the characterization of OSPA fatty acids, it is possible to know the benefits of their consumption to human nutrition. Table 1 shows the fatty acid values found in OSPA analyzed by gas chromatography coupled to fused silica capillary column and flame ionization detector.

The chemical study of OSPA revealed predominantly the presence of palmitic acid (44.41%), oleic acid (39.51%) and linoleic acid (11.43%). When analyzing OSPA in food utilization, previous studies have shown similar characterization, corroborating the findings of this study (Jorge and Luzia 2012).

The consumption of diet rich in essential fatty acids, such as palmitic, oleic and linoleic, makes nutrition healthier, generating energy and increased metabolic activity (Fuentes, 1998; Silva, 2012). Among monounsaturated fatty acids, oleic acid contributes to reduce the development of cardiac diseases due to its action in the reduction of LDL-cholesterol oxidation, being indispensable in human diet (De Angelis, 2001; Brasil et al., 2011). Oleic acid also acts by inhibiting tumor cell proliferation due to its ability to suppress HER2 (erbB-2) oncogene expression associated with the involvement of cancer etiology, progression and metastasis (Carrillo et al., 2012). Linoleic acid is a fatty acid not synthesized by the human body; therefore, essential in the human diet to ensure adequate health (El-Adawy and Taha, 2001). In addition, research has shown that *P. aquatica* seeds present essential amino acids such as threonine, tryptophan, phenylalanine and tyrosine in values higher than those found in cow's milk and chicken egg (Oliveira et al., 2000).

Studies carried out to analyze the toxicological profile of *Pachira* species such as *P. insignes* have revealed that this plant is unfit for human consumption due to the various physiological changes observed in animals submitted to experiments, possibly due to the presence of cyclopropanoid fatty acids in their chemical composition, being malvalic and sterculic acids the most prevalent (Berry, 1980). These compounds have been the subject of numerous researches on animals due to their action in developing carcinogenic activity.

Lago et al. (1987) analyzed the oil extracted from *Pachira aquatica* Aubl., seeds and observed the presence of cyclopropanic fatty acids in the Halphen assay, which makes the oil improper for consumption as food. However, the cyclopropene ring can be easily eliminated depending on the form in which it is processed, with refining being a form of elimination (Vallilo, 1999).

Another study revealed that the flour obtained from *P. aquatic* seeds incorporated into a protein diet proved to be toxic when administered to rats (Oliveira et al., 2000). The



results reinforce the need for toxicological evaluation on the oil of interest, since OSPA present cyclopropenic fatty acids in their composition and are consumed naturally by the population.

The acute toxicity test is used to determine the level of toxic or lethal potential of a substance by determining or estimating LD<sub>50</sub>. Loss of body weight and changes in water and feed intake, changes in skin, coat, eyes, mucous membranes, digestive tract and respiratory tract may provide evidence of local or systemic toxicity. The presence of stereotyped movements or behavioral changes such as lethargy, excitement, tremors, compulsive behaviors with persistent licking, convulsions, and coma may indicate influence of the substance on the central nervous system (Jahn and Gunzel, 1997; Lucio et al. OECD, 2009, Valadares, 2006).

In the acute toxicity test, the dose of 2000 mg / kg / bw did not cause mortality to animals and no clinical toxicity alteration was observed during the 14 days of test. Exposed animals showed no changes in behavior and did not present significant changes in water consumption and body weight (Table 2). Results related to the hyperlipid diet associated with food consumption and body mass of rats are conflicting in literature. In the present study, although the test group (OSPA dose of 2000 mg / kg) achieved significant reduction in feed intake when compared to the control group, no biological significance can be attributed, since no clinical signs of toxicity were observed in hipocratic screening (data not shown) and the final body weight of these animals did not differ from the control group. In addition, it is well established that lipid diets, with high level of calories, can reduce food intake in rats (Andrade et al., 2002).

No macroscopic organ abnormalities were observed during necropsy. The absolute and relative spleen weight values of the 2000 mg / kg group were significantly higher, while the kidney weight was significantly lower when compared to the control group

(Table 4). However, studies with rodents have demonstrated a considerable increase in spleen weight until 23 to 28 months of age (Domingues et al., 2012, Eurich, RE, Lindner, 1984, Lessard-Beaudoin et al., 2015, Penzes et al., 1989). In addition, research has revealed that white pulp atrophy occurs with advancing age of animals and, therefore, there is too much red pulp growth to compensate for the atrophy, which contributes to increased spleen weight (Cesta, 2006). A study with humans confirmed this hypothesis and revealed that there is an increase in the proportion of connective tissues and red pulp with aging (Al'fonsova, 2012). Nevertheless, the hypothesis that OSPA at high doses and acutely has exerted some toxic effect on the spleen cannot be ruled out.

Regarding the kidney weight of animals from the 2000 mg / kg group, rats in the control group presented higher body weight than these animals and, therefore, this reduction may be related to the lower absolute kidney weight of the test group animals. As there were no significant changes in the relative weight of the organ, and macroscopic or clinical changes were not observed either, no biological significance was attributed to this finding. As there was no death or clinical signs of toxic effect, OSPA was considered to be of low toxicity and was classified as a Class 5 substance for presenting lethal dose (LD<sub>50</sub>) above 2000 mg / kg / body weight (OECD, 2008a).

The exposure of animals to repeated 28-day doses provides information on the effects of the substance, dose concentration and determines the need or not for further long-term studies, which is an indispensable test for regulatory agencies in the characterization of a toxicological profile (OECD, 2008b). During the determination of the short-term toxicity, animals orally treated with OSPA showed normal behavior for the species, no deaths were recorded, and no macroscopic changes in vital and reproductive organs and no statistical changes in weight gain for both sexes were also observed.

Regarding water consumption, females from G1 and G2 groups that received OSPA had lower water consumption when compared to the control group, while G3 group had higher intake. Among males, animals from the G1 group had higher water and feed intake and the G3 group consumed more water when compared to the control group. Reduction in water consumption, behavioral changes, body weight and morphology may be signs of systemic toxicity, but the final body weight was normal between experimental and control groups. In Wistar rats, female body weight normally oscillates according to the animal's physiological state due to hormones such as progesterone and estrogen and this can affect dietary intake, fat deposition and water retention (Roman et al. 2014). In addition, regarding changes in water consumption of animals, previous research has shown that specific parameters, such as urea and hematocrit are considered relevant for the hydration state (Campbell et al., 2009). Toxicity studies have shown that reduced water consumption in approximately 70% of animals is associated with a 12% increase in serum urea over reference values. In this case, dehydration can be inferred from the low blood volume, which causes reduction in the plasma solvent / solute ratio, increasing the urea and hematocrit values and specific urine density (NTP, 1996a, 1996b). In this study, the results of the clinical chemical analysis and hematological indexes (Table 5 and Table 6) showed no increase in any of these parameters in relation to reference values, corroborating the hypothesis that OSPA was not toxic at the doses tested, and that these effects are inherent to the specific physiological characteristics of animals.

The satellite group may provide information on the durability, reversibility or late onset of a toxic effect related to the substance under analysis (OECD, 2008b). Test animals did not present a significant difference in any parameter analyzed when compared to the satellite control group (Table 3).

The absolute and relative weights of organs from animals submitted to the subchronic test are shown in Table 4. The relative kidney weight of females from G1 group was statistically lower than the results of the control group. Males from G1 and G2 groups presented lower but statistically significant values when compared to animals from the control group. In studies conducted by Oliveira et al. (2000), rats receiving diet based on egg white incorporated into *P. aquatica* seed meal showed hypertrophy of stomach, liver, pancreas, kidneys, heart and atrophy of lungs and spleen. However, in this study, *P. aquatica* seed oil did not reveal an increase in the weight of organs of analyzed rats when compared to control (Table 3) and did not reveal histopathological alterations that could indicate some toxic effect (Table 6). These findings may be due to the inhibition of antinutritional factors found in *P. aquatica* seed meal, such as lectins and trypsin inhibitors, which interfere with digestibility, absorption and utilization of nutrients, but because they are thermolabile, possibly such characteristics have been eliminated during oil preparation. Thus, changes are not of biological importance since no correlations in histopathological, biochemical and / or hematological studies or clinical signs of toxicity, indicating toxic association, were found. Regarding the reduction in the relative heart weight of males from G1 and G2 groups, previous research has shown that increased heart weight may be correlated with hypertrophic changes observed during chronic administration of drugs that affect ventricular inotropism or induce heart overload (Richig and Sleeper, 2014), evident in macroscopic and histopathological analyses. In this study, no such changes were observed (Figure 1 and Table 7) nor clinical signs of toxicity, suggesting that this reduction in heart weight is not related to toxicity. In addition, the results of the biochemical analysis showed no significant alterations in transaminases aspartate aminotransferase (AST) and alanine aminotransferase (ALT), normally altered in cardiac disorders (Gao et al., 2017),

nor in electrolytes (Table 5), which undergo alterations in the presence of cardiac dysfunction (Cas et al., 1995)

Regarding the results of the biochemical parameters of male rats, no statistically significant differences were found between treated and control groups (Table 5). However, in females, some statistical changes were identified for aspartate aminotransferase (OSPA group 500 mg / kg / body weight), creatinine (OSPA group 500 mg / kg / body weight), and glucose (OSPA group 250 mg / kg body weight). However, the observed differences are not statistically significant, since the reported AST and glucose values are within the normal range for the species.

Significant statistical differences were found in creatinine values of female G2 rats when compared to the control group. However, the macroscopic analysis of kidneys showed no morphological changes and biochemical values were normal for males and other groups of female rats, as well as urea values. As blood creatinine levels are proportional to muscle mass and G2 animals presented lower final body weight compared to control, possibly the low value of this hematological parameter may be related to the low weight. As there was no correlation with histopathological analyses, the hypothesis of renal damage can be ruled out.

The hematological analysis values of OSPA-treated females did not show statistical changes (Table 6) and were considered normal for the species (Lapchik et al., 2009; Lima et al., 2014; Melo et al., 2012). The results of the mean corpuscular hemoglobin concentration of male rats from the G1 group showed statistical difference when compared to the control group; however, such findings are within the normality range for the species (Lima et al., 2014).

Some histopathological changes were observed in the lung (mononuclear inflammatory infiltrate with thickening of the alveolar wall), which may indicate initial

pneumonia (Table 7). Cases of pneumonia may be associated with the gavage procedure and were detected in both test and control groups. The animals' brains (analyzed in one animal from each group) did not present any macro and microscopic alterations (Figure 1).

Some discrete and punctual and incidental findings were found in some organs (liver, heart, kidney and lung) but did not show significance since they also occurred in the control group. These findings are considered as eventual injuries and do not affect the organ functionality.

**Table 1.** Fatty acids profile obtained in *Pachira aquatica* Aublet seed oil.

**Table 2.** Body weight gain and water and feed consumption of rats orally treated with *Pachira aquatica* Aublet seed oil.

**Table 3.** Body weight and feed and water consumption of rats after 14 consecutive days of the end of short-term toxicity (satellite observation period).

**Table 4.** Absolute and relative organ weight (g / 100 g body weight) of rats orally treated with *Pachira aquatica* oil.

**Table 5.** Biochemical indicators of rats orally treated with *Pachira aquatica* oil

**Table 6.** Hematological parameters of rats orally treated with *Pachira aquatica* oil

**Table 7.** Histopathological analysis of organs treated with *Pachira aquatica* oil on short-term toxicity.

**Figure 1.** Histopathological evaluation of the organs of rats treated with *Pachira aquatica* seed oil in the short-term toxicity test. HE (20X and 40X).

#### 4. Conclusion

The results demonstrated low OSPA toxicity following acute and short-term oral exposure in this preclinical safety study. According to results of the acute toxicity study, OSPA LD<sub>50</sub> was estimated to be above 2000 mg / kg / bw, and the short-term toxicity study showed low systemic toxicity of the oil. The data obtained are of great relevance as they provide important information about a plant species of economic, nutritional and ethno-

pharmacological value and promote economic development and the safe consumption of products obtained from *Pachira aquatica* seed oil.

## **CONFLICT OF INTERESTS**

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## **ACKNOWLEDGMENTS**

To the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), to the Foundation for Support to the Development of Education, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT) for granting the scholarship (Protocol No. 59 / 300.559 / 2016).

## **TRANSPARENCY DOCUMENT**

Transparency document related to this article can be found online.

## **REFERENCES**

- Alfonsova, E. V., 2012. Functional morphology of conjunctive tissue stroma of spleen in the age aspect. *Advances in gerontology. Uspekhi gerontologii* 25, 415-421.
- Andrade, A., Pinto, S.C., Oliveira, R.S. de, 2002. *Animais de laboratório: criação e experimentação*, 1th ed, Editora Fiocruz. Rio de Janeiro.
- Berry, S. K., 1980. Cyclopropene fatty acids in some Malaysian edible seeds and nuts: I. Durian (*Durio zibethinus*, Murr). *Lipids*. 15, 452-455.
- Brasil, R. V., Cavallieri, A. L. F., Costa, A. L. M., & Gonçalves, M. A. B., 2011. Caracterização física e química do óleo de pequi exposto a diferentes condições de armazenamento. VIII Congresso de Pesquisa, Ensino e Extensão-Conpeex.
- Carrillo, C., Cavia, M., Alonso-Torre, S. R., 2012. Antitumor effect of oleic acid; mechanisms of action. A review. *Nutricion hospitalaria*. 27, 1860-1865.
- Calixto, J. B., 2000. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). *Braz J Med Biol Res*.33, 179-189.

- Camargo, M. F., 2007. Caracterização química do óleo extraído da *Pachira aquatica* Aubl.5, 19-22.
- Campbell, M.A., Golub, M.S., Iyer, P., Kaufman, F.L., Li, L.H., Messen, F.M., Morgan, J.E., Donald, J.M., 2009. Reduced water intake: Implications for rodent developmental and reproductive toxicity studies. *Birth Defects Res. Part B - Dev. Reprod. Toxicol.* 86, 157–175. <https://doi.org/10.1002/bdrb.20196>
- Cas, L.D., Metra, M., Leite, C. V, 1995. Electrolyte disturbances in chronic heart failure: Metabolic and clinical aspects. *Clin. Cardiol.* 18, 370–376. <https://doi.org/10.1002/clc.4960180704>.
- Cesta, M.F., 2006. Normal Structure, Function and Histology of the Thymus. *Toxicol. Pathol.* 34, 455–465. <https://doi.org/10.1080/01926230600867743>
- De Angelis, R. C., 2001. Novos conceitos em nutrição: reflexões a respeito do elo dieta e saúde. *Arqu Gastroenterol.* 38, 269-271.
- Dewick, P. M., 2002. Medicinal natural products: a biosynthetic approach, 2<sup>nd</sup> ed., John Wiley & Sons: New York, 2002, p. 50.
- Domingues, A., Grassi, T.F., Spinardi-Barbisan, A.L.T., Barbisan, L.F., 2012. Developmental exposure to diuron causes spleno toxicity in male Sprague-Dawley rats. *J. Environ. Sci. Heal. - Part B Pestic. Food Contam. Agric. Wastes* 47, 420–426. <https://doi.org/10.1080/03601234.2012.657054>
- Duarte, A. C. G. D. O., Fonseca, D. F., Manzoni, M. S. J., Soave, C. F., Sene-Fiorese, M., Dâmaso, A. R., & Cheik, N. C., 2006. Dieta hiperlipídica e capacidade secretória de insulina em ratos. *Revista de Nutrição.* 19, 341-348.
- El-Adawy, T. A., & Taha, K. M., 2001. Characteristics and composition of different seed oils and flours. *Food Chemistry.* 74, 47-54.
- Eurich, R.E., Lindner, J., 1984. Body weights, absolute and relative organ weights by maturation and ageing (with sexual differences), and their importance as measures of reference for metabolic investigations. *Z. Gerontol.* 17, 60–68.
- Fuentes, J., 1998. Que alimentos convêm ao coração. *Higiene Alimentar.* 12, 7-11.
- Gao, M., Cheng, Y., Zheng, Y., Zhang, W., Wang, L., Qin, L., 2017. Association of serum transaminases with short- and long-term outcomes in patients with ST-elevation myocardial infarction undergoing primary percutaneous coronary intervention. *BMC Cardiovasc. Disord.* 17, 1–8. <https://doi.org/10.1186/s12872-017-0485-6>
- Jahn, A. I., & Günzel, P. K., 1997. The value of spermatology in male reproductive toxicology: do spermatologic examinations in fertility studies provide new and additional information relevant for safety assessment? *Reprod Toxicol.* 11, 171-178.



- Jorge, N., & Luzia, D. M. M., 2012. Caracterização do óleo das sementes de *Pachira aquatica* Aublet para aproveitamento alimentar. *Acta Amazonica*, 149-156.
- Konan, N. A., Bacchi, E. M., Lincopan, N., Varela, S. D., & Varanda, E. A., 2007. Acute, subacute toxicity and genotoxic effect of a hydroethanolic extract of the cashew (*Anacardium occidentale* L.). *Journal of Ethnopharmacology*. 110, 30-38.
- Kretschmer, B. D., Schelling, P., Beier, N., Liebscher, C., Treutel, S., Krüger, N., Scholz H. P., Haus, A., 2005. Modulatory role of food, feeding regime and physical exercise on body weight and insulin resistance. *Life sciences*. 76, 1553-1573.
- Lago, R. C. A., Pereira, D. A., Siqueira, F. A. R., Szpiz, R. R., Oliveira, J. P., 1986/87. Estudo preliminar das sementes e do óleo de cinco espécies da Amazônia. *Acta Amazônica*. 16/17, 369-376.
- Lessard-Beaudoin, M., Laroche, M., Demers, M. J., Grenier, G., Graham, R. K., 2015. Characterization of age-associated changes in peripheral organ and brain region weights in C57BL/6 mice. *Experimental gerontology*, 63, 27-34.
- Lima, C. M., Lima, A. K., Melo, M. G. D., Dória, G. A. A., Serafini, M. R., Albuquerque-Júnior, R. L. C., & Araújo, A. A. S., 2014. Valores de referência hematológicos e bioquímicos de ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério da Universidade Tiradentes. *Scientia Plena*, 10.
- Lorençon, J. R., Andrade, S. C., & Andrade, D. J., 2016. Mites occurrence on *Pachira aquatica* Aubl. including aspects of external mouthpart morphology of *Brachytydeus formosa* (Acari: Tydeidae). *Brazilian Journal of Biology*. 76, 136-143.
- Lucio, E. D. A., Rosalen, P. L., Sharapin, N., & Souza Brito, A. R. M., 2000. Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da episiopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 9, 23-35.
- Martey, O. K., Armah, G., & Okine, L. K. N. A., 2010. Absence of organ specific toxicity in rats treated with *Tonica*, an aqueous herbal haematinic preparation. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines*. 7, 231-240.
- Moraes, F. P., & Colla, L. M., 2006. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. *Revista eletrônica de farmácia*. 3, 109-122.
- NTP, 1996a. Final report on the short term reproductive and developmental toxicity of chlorodibromo-methane (CAS No. 124-48-1) administered in drinking water to Sprague dawley rats. NTIS Technical Report (NTIS/PB97-111728) (NTPRDGT-94-007). North Carolina.
- NTP, 1996b. Sodium selenate: short term reproductive and developmental toxicity study when administered to Sprague-Dawley rats in the drinking water—final report, volume 1. NTIS Technical Report (NTIS/PB96-190616) (NTP-RDGT-94-011-V1). North Carolina.
- OECD, 2008a. Test No. 425: Acute Oral Toxicity: Up-and-down Procedure. Organisation for Economic Co-operation and Development Publishing.

OECD, 2008b. Test No. 407: Repeated Dose 28-day Oral Toxicity Study in Rodents. Organisation for Economic Co-operation and Development Publishing.

Oliveira, J. T. A., Vasconcelos, I. M., Bezerra, L. C. N. M., Silveira, S. B., Monteiro, A. C. O. & Moreira, R. A., 2000. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* St Hil et Naud and *Terminalia catappa* Linn. *Food Chemistry*. 70, 185-191.

Peixoto, A. L., Escudeiro, A., 2002. *Pachira aquatica* (Bombacaceae) na obra “história dos Animais e Árvores do Maranhão” de Frei Cristóvão de Lisboa. *Rodriguésia*. 123-130.

Penzes, L., Izsak, J., Beregi, E., 1989. Changes of organ indices of CBA/Ca inbred mice as function of age. *Z. Gerontol*. 22, 170–174.

Richig, J., Sleeper, M., 2014. *Electrocardiography of Laboratory Animals*. Academic Press.

Roman, S., Dambros, A., Rosset, A., Pistore, M., Schimid, A., Cansian, R., 2014. Toxicidade materna e reprodutiva de extrato hidroalcoólico de *Sonchus oleraceus* L. em ratos wistar. *Rev Perspect*. 38, 69-77.

Silva, A. E. D. S. D., 2012. Identificação e quantificação via técnicas cromatográficas de ácidos graxos com potencial farmacológico em frutos amazônicos. Doctoral dissertation, Universidade de São Paulo.

Silva, B. D. L. D. A., Bora, P. S., Azevedo, C. C. D., 2010. Caracterização química parcial das proteínas das amêndoas da munguba (*pachira aquatica* aubl). *Revista do Instituto Adolfo Lutz (Impresso)*. 69, 333-340.

Souza, V., Lorenzi, H., 2008. *Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG II*. São Paulo. Nova Odessa. 704.

Valadares, M. C., 2006. Avaliação de toxicidade aguda: estratégias após a “era do teste DL50”. *Revista Eletrônica de Farmácia*. 3, 93-98.

Vallilo, M. I., 1999. *Lecythis pisonis* camb. Nuts: oil characterization, fatty acids and minerals. *Food chem*. 66, 197-200.

## Tables

**Table 1**  
Fatty acids profile obtained in *Pachira aquatica* Aublet seed oil.

Compounds	No. carbons	Oil content (%)
Palmitic acid	(C 16:0)	44.41±0.41
Stearic acid	(C 18:0)	3.27±0.04
Oleic acid	(C 18:1)	39.51±0.33
Linoleic acid	(C 18:2)	11.43±0.11
Linolenic acid	(C 18:3)	0.47±0.01
Arachidic acid	(C 20:0)	0.81±0.02
Behenic acid	(C 22:0)	0.10±0.01
Saturated		48.59
Monounsaturated		39.51
Polyunsaturated		11.9

The results represent the mean ± standard deviation of the analysis performed in triplicate.

**Table 2**Body weight gain and water and feed consumption of rats orally treated with *Pachira aquatica* Aublet seed oil.

	Acute toxicity		Short-term toxicity					
	Control	2000 mg/kg	Control	Satellite Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satellite
<b>Females</b>								
Initial weight (g)	150.4 ± 6.427	145.2 ± 2.168	120.0 ± 6.442	120.0 ± 8.456	120.0 ± 13.40	120.0 ± 8.396	120.0 ± 10.27	118.4 ± 12.97
Final Weight (g)	157.4 ± 7.335	155.2 ± 4.087	184.2 ± 12.34	188.8 ± 9.960	179.4 ± 11.91	181.2 ± 13.48	182.8 ± 14.46	185.6 ± 11.15
Body weight gain (g)	7.000 ± 4.848	10.00 ± 2.739	64.20 ± 12.91	68.80 ± 6.760	59.40 ± 9.397	61.20 ± 5.762	62.80 ± 6.058	67.20 ± 7.225
Body weight gain (%)	4.680 ± 3.245	6.880 ± 1.864	53.79 ± 11.93	57.59 ± 7.114	50.38 ± 11.62	50.99 ± 2.787	52.47 ± 4.783	57.60 ± 11.40
Food intake (g/day)	95.07 ± 15.06	83.21 ± 17.44**	84.36 ± 25.53	81.79 ± 9.994	77.43 ± 7.762	79.18 ± 7.186	86.82 ± 27.62	76.39 ± 7.238
Water intake (mL/day)	154.4 ± 16.16	157.4 ± 12.80	172.3 ± 28.53	166.1 ± 26.70	110.8 ± 14.62**	150.7 ± 24.92*	190.9 ± 39.52*	153.0 ± 22.79
<b>Males</b>								
Initial weight (g)			152.0 ± 16.12	152.0 ± 25.11	152.2 ± 30.84	152.0 ± 28.39	152.0 ± 25.11	155.8 ± 15.69
Final Weight (g)			271.8 ± 23.53	288.6 ± 38.99	282.6 ± 25.44	282.0 ± 16.51	263.2 ± 14.81	279.2 ± 23.76
Body weight gain (g)			119.8 ± 21.92	136.6 ± 30.39	130.4 ± 23.61	130.0 ± 19.58	111.2 ± 20.91	123.4 ± 16.38
Body weight gain (%)			79.84 ± 18.16	91.83 ± 23.32	89.94 ± 29.08	89.20 ± 25.26	76.55 ± 27.44	79.74 ± 12.36
Food intake (g/day)			105.5 ± 11.32	118.8 ± 14.41	116.0 ± 15.68*	114.6 ± 10.27	110.8 ± 15.12	108.2 ± 13.34
Water intake (mL/day)			180.7 ± 28.47	205.1 ± 26.25	202.1 ± 24.48*	192.1 ± 21.35	200.9 ± 32.40*	177.8 ± 31.95

Values expressed as mean ± standard deviation, n = 5 animals / group and n = 10 animals / group for short-term toxicity.

\* p &lt;0.05 compared to the control group; \*\* p &lt;0.01 compared to the control group. Student's t-test on acute toxicity and ANOVA / Dunnett's on the short-term toxicity test.

**Table 3**

Body weight gain and feed and water consumption of rats after 14 consecutive days of the end of short-term toxicity period (satellite observation period).

	Initial weight 29 days (g)	Final weight 43 days (g)	Body weight gain (g)	Body weight gain (%)	Food intake (g/ days)	Water intake (mL/ days)
Females						
Satellite Control	190.8 ± 8.983	194.4 ± 9.965	3.600 ± 3.130	1.880 ± 1.579	84.79 ± 8.294	203.2 ± 31.29
Satellite	184.6 ± 11.08	188.6 ± 9.762	4.400 ± 2.302	2.412 ± 1.241	81.36 ± 6.535	193.2 ± 38.69
Males						
Satellite Control	290.6 ± 42.18	303.0 ± 39.04	12.40 ± 4.506	4.473 ± 2.124	133.4 ± 26.79	212.5 ± 24.71
Satellite	282.2 ± 26.25	294.4 ± 27.88	12.60 ± 7.570	4.494 ± 2.824	133.6 ± 23.32	214.8 ± 27.52

Values expressed as mean ± standard deviation. n = 5 animals / group.

\* p < 0.05 compared to the satellite control group. Student's t-test.

**Table 4**Absolute and relative organ weight (g / 100 g body weight) of rats orally treated with *Pachira aquatica* oil.

	Acute toxicity		Short-term toxicity					
	Control	2000 mg/kg	Control	Satellite Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satellite
<b>Females</b>								
Heart (g)	0.568 ± 0.035	0.593 ± 0.050	0.566 ± 0.064	0.657 ± 0.065	0.485 ± 0.079	0.517 ± 0.088	0.560 ± 0.042	0.614 ± 0.090
Heart (g/100g)	0.362 ± 0.020	0.382 ± 0.028	0.329 ± 0.028	0.353 ± 0.045	0.293 ± 0.031	0.308 ± 0.041	0.333 ± 0.015	0.341 ± 0.049
Lung (g)	0.968 ± 0.162	0.910 ± 0.077	0.965 ± 0.037	1.074 ± 0.093	0.913 ± 0.031	0.906 ± 0.163	1.054 ± 0.133	1.244 ± 0.110
Lung g/100g)	0.615 ± 0.082	0.586 ± 0.050	0.563 ± 0.027	0.574 ± 0.031	0.555 ± 0.034	0.546 ± 0.117	0.626 ± 0.047	0.690 ± 0.056
Liver (g)	7.717 ± 0.769	7.032 ± 0.285	5.833 ± 0.264	6.205 ± 0.647	4.967 ± 0.354	5.427 ± 0.923	6.059 ± 0.391	6.473 ± 0.615
Liver (g/100g)	4.908 ± 0.339	4.533 ± 0.194	3.408 ± 0.205	3.317 ± 0.238	3.012 ± 0.110	3.234 ± 0.388	3.619 ± 0.300	3.588 ± 0.232
Spleen (g)	0.321 ± 0.023	0.378 ± 0.021*	0.402 ± 0.027	0.449 ± 0.031	0.353 ± 0.015	0.379 ± 0.077	0.406 ± 0.050	0.471 ± 0.050
Spleen (g/100g)	0.205 ± 0.017	0.243 ± 0.013*	0.234 ± 0.011	0.240 ± 0.016	0.215 ± 0.015	0.226 ± 0.037	0.242 ± 0.028	0.261 ± 0.022
Kidney (g)	0.744 ± 0.048	0.681 ± 0.037*	0.705 ± 0.064	0.697 ± 0.057	0.565 ± 0.053	0.638 ± 0.127	0.707 ± 0.096	0.705 ± 0.077
Kidney (g/100g)	0.474 ± 0.036	0.439 ± 0.019	0.411 ± 0.026	0.372 ± 0.015	0.342 ± 0.017*	0.380 ± 0.053	0.420 ± 0.030	0.390 ± 0.028
Ovary (g)	0.062 ± 0.013	0.065 ± 0.010	0.071 ± 0.010	0.059 ± 0.012	0.069 ± 0.006	0.072 ± 0.018	0.058 ± 0.016	0.057 ± 0.023
Ovary (g/100g)	0.039 ± 0.008	0.042 ± 0.006	0.041 ± 0.004	0.031 ± 0.005	0.042 ± 0.004	0.043 ± 0.011	0.034 ± 0.007	0.031 ± 0.013
Uterus (g)	0.431 ± 0.154	0.402 ± 0.052	0.374 ± 0.186	0.348 ± 0.094	0.272 ± 0.068	0.318 ± 0.184	0.467 ± 0.160	0.443 ± 0.182
Uterus (g/100g)	0.274 ± 0.094	0.259 ± 0.037	0.218 ± 0.110	0.186 ± 0.051	0.166 ± 0.050	0.190 ± 0.110	0.274 ± 0.078	0.242 ± 0.090
<b>Males</b>								
Heart (g)			0.898 ± 0.070	0.937 ± 0.144	0.804 ± 0.056	0.843 ± 0.105	0.802 ± 0.035	0.953 ± 0.077
Heart (g/100g)			0.366 ± 0.035	0.317 ± 0.011	0.313 ± 0.027*	0.326 ± 0.028*	0.336 ± 0.014	0.333 ± 0.010
Lung (g)			1.381 ± 0.156	1.433 ± 0.114	1.378 ± 0.171	1.362 ± 0.179	1.437 ± 0.101	1.500 ± 0.227
Lung g/100g)			0.567 ± 0.108	0.492 ± 0.066	0.533 ± 0.037	0.527 ± 0.050	0.603 ± 0.065	0.522 ± 0.048
Liver (g)			8.739 ± 0.690	9.835 ± 1.370	9.290 ± 0.945	9.305 ± 0.990	9.286 ± 1.170	9.473 ± 1.600
Liver (g/100g)			3.555 ± 0.167	3.337 ± 0.086	3.602 ± 0.141	3.605 ± 0.223	3.878 ± 0.332	3.296 ± 0.290
Spleen (g)			0.579 ± 0.054	0.590 ± 0.074	0.580 ± 0.067	0.554 ± 0.036	0.552 ± 0.036	0.584 ± 0.091
Spleen (g/100g)			0.236 ± 0.028	0.201 ± 0.018	0.225 ± 0.012	0.215 ± 0.011	0.231 ± 0.018	0.203 ± 0.019
Kidney (g)			1.009 ± 0.097	1.170 ± 0.120	1.025 ± 0.050	1.030 ± 0.105	1.028 ± 0.093	1.163 ± 0.166
Kidney (g/100g)			0.411 ± 0.041	0.398 ± 0.018	0.399 ± 0.025	0.399 ± 0.021	0.430 ± 0.027	0.405 ± 0.031

Testis (g)	1.522 ± 0.102	1.460 ± 0.234	1.500 ± 0.057	1.453 ± 0.174	1.450 ± 0.121	1.568 ± 0.165
Testis (g/100g)	0.620 ± 0.043	0.495 ± 0.047	0.585 ± 0.054	0.562 ± 0.045	0.608 ± 0.061	0.549 ± 0.047
Epididymis (g)	0.426 ± 0.023	0.507 ± 0.055	0.430 ± 0.036	0.480 ± 0.090	0.434 ± 0.053	0.501 ± 0.085
Epididymis (g/100g)	0.173 ± 0.010	0.173 ± 0.016	0.168 ± 0.019	0.185 ± 0.028	0.181 ± 0.021	0.175 ± 0.026

Values expressed as mean ± standard deviation. n = 5 animals / group and n = 10 animals / group for short-term toxicity.

\* p <0.05 compared to the control group; Student's t-test on acute toxicity and ANOVA / Dunnett's on the short-term toxicity test.

**Table 5**  
Biochemical indicators of rats orally treated with *Pachira aquatica* oil.

	Short-term toxicity						Reference values
	Control	Satellite Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satellite	
<b>Females</b>							
Uric Acid (mg/dL)	1.920 ± 0.694	1.340 ± 0.279	1.700 ± 0.681	1.580 ± 0.370	1.120 ± 0.178	1.800 ± 0.796	1-3.2 a
Alanine aminotransferase (U/L)	24.54 ± 3.218	19.90 ± 2.087	22.52 ± 8.267	30.54 ± 3.699	28.62 ± 8.472	19.56 ± 2.028	17-50 b
Aspartate aminotransferase (U/L)	84.52 ± 9.491	87.04 ± 9.738	94.88 ± 41.46	126.6 ± 15.22*	103.5 ± 17.22	90.62 ± 18.98	51-211 a
Total cholesterol (mg/dL)	60.93 ± 12.01	55.42 ± 16.16	49.08 ± 19.14	55.58 ± 3.618	58.76 ± 5.000	48.14 ± 2.858	46-92 b
Creatinine (mg/dL)	0.320 ± 0.083	0.260 ± 0.054	0.260 ± 0.089	0.180 ± 0.083*	0.340 ± 0.054	0.280 ± 0.044	0.2-0.5c
Glucose (mg/dL)	128.2 ± 31.93	111.6 ± 14.10	89.56 ± 25.93*	109.0 ± 24.52	94.22 ± 13.16	99.56 ± 10.63	72-193 a
Potassium (mmol/L)	6.020 ± 0.571	5.680 ± 0.580	6.260 ± 0.568	5.680 ± 0.526	5.500 ± 0.255	6.640 ± 0.503	3.6-6.7 a
Sodium (mmol/L)	138.6 ± 1.342	137.4 ± 5.857	137.6 ± 2.302	138.2 ± 1.095	137.8 ± 0.447	139.8 ± 0.836	142-151 a
Triglycerides (mg/dL)	39.60 ± 11.52	31.22 ± 5.791	45.09 ± 17.45	43.87 ± 10.88	50.46 ± 10.73	32.32 ± 6.597	23-138 <sup>a</sup>
Urea (mg/dL)	45.62 ± 3.175	45.87 ± 6.304	47.03 ± 13.40	46.01 ± 5.466	51.21 ± 8.805	42.55 ± 4.070	32-54 b
<b>Males</b>							
Uric Acid (mg/dL)	2.140 ± 1.212	1.520 ± 0.486	1.420 ± 0.109	2.120 ± 0.970	2.140 ± 0.472	2.140 ± 0.279	1-3.2 a
Alanine aminotransferase (U/L)	30.98 ± 14.70	20.76 ± 1.234	25.70 ± 2.731	27.06 ± 7.692	30.52 ± 6.405	22.90 ± 2.923	17-50 b
Aspartate aminotransferase (U/L)	94.58 ± 37.82	76.64 ± 6.301	87.24 ± 9.559	87.34 ± 20.17	102.3 ± 9.146	85.92 ± 9.037	39-93 a
Total cholesterol (mg/dL)	71.51 ± 14.58	70.22 ± 8.341	68.00 ± 5.344	57.73 ± 9.160	58.59 ± 6.532	68.87 ± 5.248	46-92 b
Creatinine (mg/dL)	0.280 ± 0.044	0.200 ± 0.0	0.300 ± 0.0	0.260 ± 0.054	0.300 ± 0.0	0.200 ± 0.0	0.2-0.5c
Glucose (mg/dL)	103.0 ± 21.37	101.9 ± 14.29	104.9 ± 19.12	111.2 ± 36.83	91.42 ± 22.75	129.9 ± 17.01	72-193 a
Potassium (mmol/L)	6.920 ± 1.470	5.840 ± 0.618	5.520 ± 0.319	6.320 ± 1.071	6.940 ± 1.370	6.760 ± 0.536	3.9-7.9 a
Sodium (mmol/L)	137.4 ± 2.302	140.2 ± 1.095	138.0 ± 1.871	136.4 ± 1.817	138.6 ± 1.140	140.4 ± 0.547	125-143a
Triglycerides (mg/dL)	40.06 ± 3.710	45.20 ± 9.788	47.03 ± 9.035	34.39 ± 9.959	30.20 ± 4.710	47.71 ± 10.32	57.27-106.7c
Urea (mg/dL)	31.90 ± 3.827	33.00 ± 1.464	37.49 ± 2.648	34.03 ± 6.819	32.06 ± 3.695	35.15 ± 2.909	32-54 b

Values expressed as mean ± standard deviation. N = 10 animals / group for short-term toxicity.

\* p < 0.05 (ANOVA / Dunnett) compared to the control group (ANOVA / Dunnett).

a (Lima et al., 2014).

b (Lapchik et al., 2009).

c (Dantas et al., 2006).





NF - not found. Values expressed as mean  $\pm$  standard deviation. n = 10 animals / group for short-term toxicity.

\* p < 0.05 (ANOVA / Dunnett) compared to the control group.

a (Lima et al., 2014).

b (Lapchik et al., 2009).

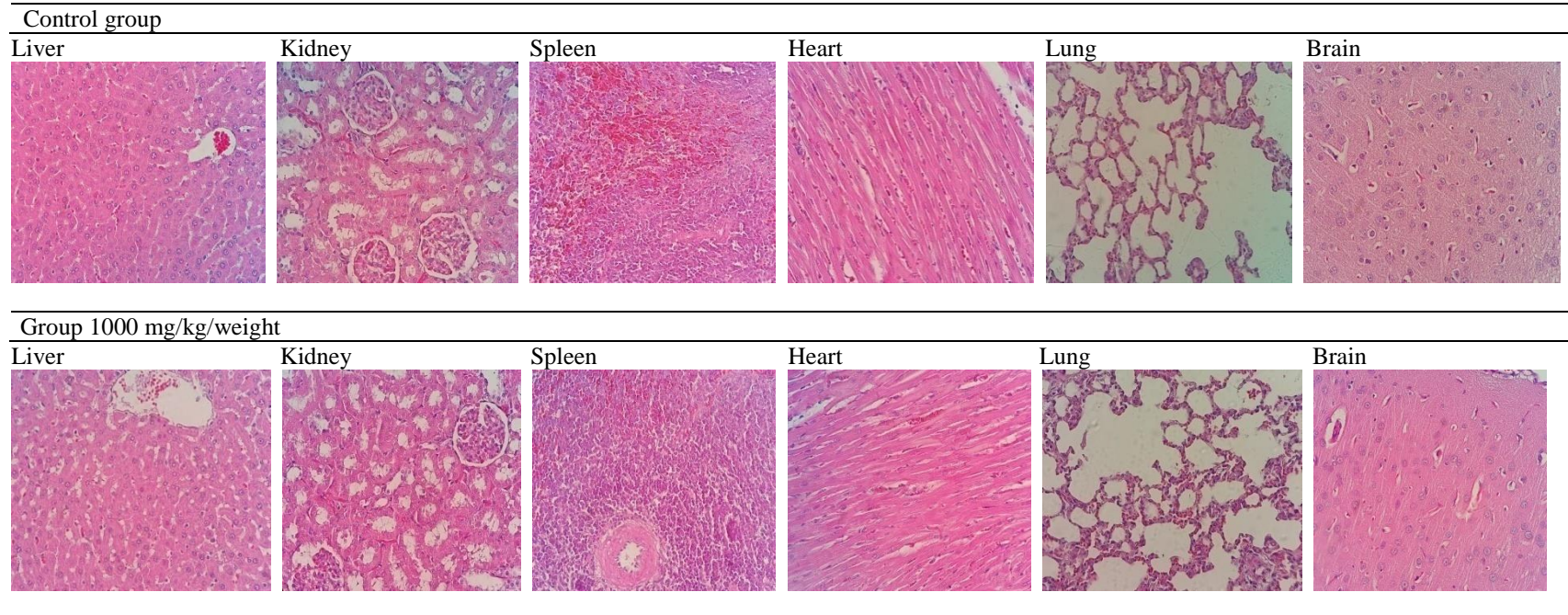
c (Melo, Dória, Serafini, Araújo, 2012).

**Table 7**  
Histopathological analysis of organs treated with *Pachira aquatica* oil on short-term toxicity.

Short-term toxicity		
	Macroscopic findings	Histopathological findings
Females		
Control	No changes	Lung: discrete foci of thickening of the alveolar wall
Satellite Control	No changes	Lung: Multifocal areas to coalescing of thickening of the alveolar wall; Liver: discrete multifocal congestion *;
250 mg/kg	No changes	Lung: discrete foci of thickening of the alveolar wall; Liver: discrete focal mononuclear inflammatory infiltrate *
500 mg/kg	No changes	Lung: Extensive focal areas of thickening of the alveolar wall; Liver: focal mononuclear inflammatory infiltrate *
1000 mg/kg	No changes	Lung: Extensive focal areas of thickening of the alveolar wall; Liver: focal mononuclear inflammatory infiltrate *
Satellite	No changes	Lung: coalescing areas of thickening of the alveolar wall; Liver: multifocal congestion of central veins and vessels *
Males		
Control	Lung - color change	Lung: foci of thickening of the alveolar wall; Liver: centrilobular region shows discrete microvacuolations *
Satellite Control	No changes	Lung: foci of thickening of the alveolar wall; Liver: discrete multifocal congestion *
250 mg/kg	No changes	Lung: slight thickening of the alveolar wall; Heart: cardiomyocyte necrosis *
500 mg/kg	No changes	Lung: discrete foci of thickening of the alveolar wall;
1000 mg/kg	Lung - color change	Lung: focally extensive areas of thickening of the alveolar wall; Kidney: discrete multifocal congestion *
Satellite	No changes	Lung: Multifocal areas with thickening to coalescing of the alveolar wall

Incidental Finding \*

## Figures



**Figure 1.** Histopathological evaluation of organs treated with *Pachira aquatica* seed oil in the short-term toxicity assay. HE (20X and 40X).

## **5.2 Artigo II: Revista Food & Function (Qualis B1)**

Depois de versado para o inglês será submetido ao periódico “*Food & Function*” (Fator de Impacto 3.289, Qualis B1 na área Medicina II).

Link com as normas da revista: <http://www.rsc.org/journals-books-databases/journal-authors-reviewers/prepare-your-article/#format-layout>

**Avaliação da segurança do Óleo da semente de *Pachira aquatica* Aublet:  
análise do potencial genotóxico e clastogênico**

Jhony Moreira Marcelino\*<sup>a</sup>, Ramão Souza de Deus Junior<sup>a</sup>, Flávio Henrique Souza de Araújo<sup>a</sup>, Gustavo Roberto Villas Boas<sup>b</sup>, Zaira da Rosa Guterres<sup>c</sup>, Fernando Freitas de Lima<sup>d</sup> e Silvia Aparecida Oesterreich<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> *Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: jhony.moreira@hotmail.com.br, juniormsbrasil@hotmail.com, flaviobiosmart@gmail.com, silviaoesterreich@gmail.com; Tel: +55 (67) 3410-2001*

<sup>b</sup> *Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal do Oeste da Bahia, Barreiras, Bahia, Brasil. E-mail: gustavo.villasboas@gmail.com; Tel: +55 (77) 3614-3152*

<sup>c</sup> *Laboratório de Fitogênese e Mutagênese da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, Dourados, Mato Grosso do Sul, Brasil. E-mail: zairaguterres@yahoo.com.br; Tel: +55 (67) 3923-3181*

<sup>d</sup> *Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, Brasil. E-mail: flfernando\_@hotmail.com; Tel: +55 (19) 3521-6727*

\* **Autor Correspondente:** Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Grande Dourados. Rodovia Dourados - Itahum, Km 12. Caixa Postal - 533. CEP: 79.804-970. Dourados, MS, Brasil. Telefone: + 55 67 999994979. E-mail: jhony.moreira@hotmail.com.br

## <sup>1</sup>Abreviações

<sup>1</sup> ANOVA: análise de variância; *flr*<sup>3</sup>: Flare; FID: detector de ionização de chama; LD<sub>50</sub>: dose letal; MN-PCEs: eritrócitos policromáticos micronucleados; *mwh*: Multiple wing hairs; NCEs: eritrócitos normocromáticos; OECD: Organisation for Economic Cooperation and Development; OSPA: óleo da semente de *Pachira aquatica* Aublet; LOH: Perda de heterozigosidade; SEM: erro padrão de média; SMART: teste de mutação e recombinação somática UFGD: Universidade Federal da Grande Dourados.

## Resumo

Com o aumento do uso de plantas na alimentação e no uso nutracêutico, pesquisas vem sendo empregadas com intuito de avaliar a segurança durante o consumo, estimulando conseqüentemente o seu uso racional pela população. A *Pachira aquatica* representa uma dessas plantas a ser investigada, visto que há escassez de informações acerca do seu potencial toxicológico durante ou após seu consumo. Sendo assim, o estudo teve como objetivo analisar a genotoxicidade, citotoxicidade e os efeitos clastogênicos do óleo da semente de *Pachira aquatica* Aublet (OSPA) em ratos *Wistar* e em *Drosophila melanogaster*. Para isto, foram empregados os testes do micronúcleo e cometa. Os ratos foram tratados oralmente por 28 dias com OSPA nas doses de 250, 500 e 1000 mg/kg. Após isso, células da medula óssea foram coletadas para análise da frequência de micronúcleos e células de sangue periférico foram obtidas para realização do ensaio do cometa. No teste SMART foi utilizado o cruzamento padrão entre três linhagens mutantes de *D. melanogaster*. As larvas foram tratadas com OSPA em diferentes concentrações e as asas das moscas adultas foram avaliadas quanto à presença/frequência de manchas mutantes e comparadas ao grupo controle negativo. Os testes realizados nos ratos evidenciaram que o OSPA não apresentou efeitos genotóxicos ou clastogênicos significativos nas células analisadas das três doses testadas. Os metabólitos de biotransformação do OSPA não apresentam atividade genotóxica, como demonstrado pelo teste SMART nos descendentes do cruzamento de alta bioativação. Conjuntamente, todos os resultados indicam que o OSPA não revelou toxicidade genética pré-clínica.

**Palavras-chave:** Segurança pré-clínica; Nutracêutico; Mutagenicidade, Genotoxicidade, Ensaio de cometa; Micronúcleo; Teste SMART.



## 1. Introdução

Atualmente, a fome no planeta e a ausência de alimentos que auxiliam na promoção da saúde, representam os assuntos mais discutidos e alvos de vários estudos que tentam aliviar as causas deste problema mundial. Apesar dos avanços na produção de alimentos, a fome ainda é uma realidade de muitos países. Devido a isso, as plantas, por oferecerem uma importante fonte de recursos nutritivos, têm se tornado de amplo consumo por seres humanos e animais. Além disso, as plantas contribuem significativamente para o desenvolvimento industrial e, conseqüentemente, econômico dos países em desenvolvimento, visto que servem como matéria-prima para desenvolvimento de novos produtos de interesse farmacêutico, cosmético, bem como possuem importante valor econômico para as indústria de polpas, doces, produtos lácteos, destilados alcoólicos, entre outras.<sup>1-3</sup>

A *Pachira aquatica* Aublet (PAA) é uma árvore pertencente à subfamília *Bombacoideae* da família *Malvaceae*, nativa do sul do México até a área Norte da América do Sul.<sup>4</sup> Suas sementes são consumidas *in natura*, torrada, cozida ou assada. Pesquisas prévias acerca do valor nutricional do fruto da PAA revelaram considerável quantidade de proteínas, flavonoides e antocianinas, quantidades reduzidas de carotenoides como, por exemplo,  $\beta$ -caroteno e licopeno.<sup>5, 6</sup> Ainda, suas sementes vêm sendo exploradas por serem uma potente fonte de lipídios, tendo o ácido palmítico como principal ácido graxo.<sup>1</sup>

O consumo das sementes de PAA tem aumentado devido a seu fácil acesso e sua boa palatabilidade. No entanto, estudos envolvendo outras espécies da família *Malvacea*, revelaram no óleo de *Pachira insigenes* importante toxicidade, devido às várias alterações fisiológicas acometidas em animais, sendo impróprio para

consumo humano.<sup>8,9</sup> Assim, a escassez de estudos científicos e informações sobre segurança da planta, torna o uso na alimentação inseguro e irracional.<sup>7</sup>

É notória a importância e a necessidade de pesquisas que buscam a inserção de informações sobre a utilização segura, pois, mesmo que determinada espécie apresente baixa toxicidade, seu uso impróprio podem produzir danos irreversíveis à saúde dos consumidores.<sup>3,8</sup> Sendo assim, analisar os efeitos adversos são ferramentas importantes para o emprego de novos alimentos de alto valor nutritivo na alimentação e no aumento do crescimento econômico.

A pesquisa no campo da genética toxicológica possui fundamental importância para identificação de toxicidade dos novos recursos alimentícios e/ou industriais direcionados a humanos. Como demonstrado anteriormente, algumas espécies da subfamília *Bombacoideae* são impróprias para o consumo humano podendo causar danos no DNA através da modificação da sua estrutura e/ou geração de aberrações cromossômicas, acarretando doenças fatais como, por exemplo, o câncer.<sup>7, 10</sup>

Atualmente, vários ensaios *in vitro* e *in vivo* fornecem as ferramentas para análise e identificação de agentes que expõem os usuários a riscos genotóxicos.<sup>11, 12</sup> Ensaio de genotoxicidade são utilizados para identificar extratos/substâncias que têm capacidade de interagir com ácidos nucleicos em baixas concentrações produzindo desde aberrações cromossômicas e/ou alterações na estrutura do DNA até mudanças irreversíveis na célula.<sup>13</sup> As consequências desse comprometimento ao DNA poderiam ser o estabelecimento e/ou predisposição a doenças, aumento da morbidade/mortalidade, mudanças nas características hereditárias e capacidade reprodutiva prejudicada.<sup>14</sup>

O teste de mutação e recombinação somática (SMART) em *Drosophila melanogaster*, identifica mutação genética e a fragmentação cromossômica de uma forma rápida através da asa da mosca.<sup>15</sup> O ensaio cometa detecta a ruptura dos filamentos de DNA em células e o micronúcleo identifica os danos cromossômicos na medula óssea.<sup>16</sup> Sendo assim, o objetivo da presente pesquisa foi avaliar o potencial genotóxico, citotóxico e efeitos clastogênicos do óleo extraído da semente de *P. aquatica* em ratos submetidos à modelos experimentais de genotoxicidade e através do teste SMART realizado em *D. melanogaster*.

## **1. Materiais e Métodos**

### **2.1. Coleta da planta e identificação**

Frutos de *Pachira aquatica* Aublet foram coletados no município de Dourados-Mato Grosso do Sul (latitude 22°14'25.869", longitude 54°47'23.153" e elevação de 450m) em março de 2017, de acordo com uma autorização emitida pela Agência Ambiental Brasileira (nº55046-1 e MMA/ ICMBio/ SISBIO). A espécie foi identificada pela Dr.<sup>a</sup> Zefa Valdivina Pereira e depositadas no Herbário da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) sob o número 5.407.

### **2.2. Preparo do óleo**

Foram selecionados os frutos que se apresentavam no estágio final de maturação, quando ocorre a ruptura espontânea do pericarpo. As sementes (amêndoas) foram retiradas do fruto, higienizadas e sanitizadas em solução de dicloroisocianurato de sódio dihidratado 0,66% (teor de cloro ativo 3%) por 10 minutos e enxaguadas em água corrente. Em seguida, foi removida a casca

externa das sementes e seu endosperma foi desidratado a 45°C por 48 horas em uma estufa de circulação de ar, resfriadas em temperatura ambiente e submetidas à extração por uma prensa a frio do tipo “*expeller*”. O óleo extraído foi centrifugado a 15.000 rpm durante 15 minutos e o sobrenadante transferido para recipientes tipo âmbar e armazenado sob refrigeração (-7 °C) até sua utilização.

### **2.3. Animais e tratamentos**

Para o teste cometa e micronúcleo foram utilizados 50 ratos *Wistar (Rattus norvegicus albinus)* sendo 25 fêmeas e 25 machos, entre oito e dez semanas de idade, com peso médio de 118 a 155g, provenientes do biotério central da Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD). Os animais foram alojados em gaiolas de polipropileno (5 animais cada), no período de ambientação e experimentação, em condições padrões (23 ± 2 °C, 50 a 60% umidade e um ciclo de luz e escuridão de 12 h controlado por um temporizador automático) com água e alimentação *ad libitum*. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em experimentação Animal (CEUA) da UFGD sob protocolo nº 38/2016, respeitando as orientações para os cuidados com animais de laboratório e considerações éticas.

Os animais foram divididos em cinco grupos contendo 5 fêmeas e 5 machos, sendo: grupo controle negativo, tratado por 28 dias com óleo de milho; grupos de teste, tratados por 28 dias com OSPA via oral (gavagem) nas doses de 250 mg kg<sup>-1</sup>; 500 mg kg<sup>-1</sup> e 1000 mg kg<sup>-1</sup>; grupo de controle positivo, tratado com 50 mg por kg por pc de mono-hidrato de ciclofosfamida, i.p. 24 horas antes da eutanásia (fig. 1).

## **2.4. Estudos da Genotoxicidade e Mutagenicidade**

O desenho experimental dos ensaios de micronúcleo e cometa levaram em consideração as diretrizes proposta pelos Guidelines da OECD (Organisation for Economic Co-operation and Development).<sup>17, 18</sup>

## **2.5. Ensaio do micronúcleo**

Após a eutanásia, dissecou-se o fêmur direito de cada animal e as duas epífises foram retiradas de modo a expor a medula óssea. Com auxílio de uma seringa (1mL) com agulha foi injetado soro bovino fetal no canal medula óssea de modo a empurrar para um tubo de ensaio. A suspensão foi centrifugado a 1000 rpm por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e com o pellet foi feito um esfregão em lâmina de vidro, que secou em temperatura ambiente por 24 horas. A fixação foi feita em metanol por 10 minutos. Após o período de 24 horas, a lâmina foi corada com Giemsa, lavada com água destilada e a lamínula foi colocada.

A análise foi feita em microscópio óptico, em aumento de 100x, analisando em condições a cega um total de 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal, identificando quanto a ausência ou presença de micronúcleos (MNs) (Fig.2). Para a análise citotóxica, foram contados 100 eritrócitos aleatórios de cada animal e classificados em monocromáticos e policromáticos.

## **2.6. Ensaio cometa**

Após os 28 dias de tratamento, 40 µL do sangue periférico de cada animal foi obtido através do corte de ponta de cauda. O sangue foi adicionado em *ependorfs* heparinizados com 120µL de agarose de baixo ponto de fusão. A

amostra foi homogeneizada distribuída em lâminas (duplicata), previamente preparadas com uma fina camada de agarose padrão, mantendo protegida do contato com a luz. As lâminas foram transferidas para refrigerador a 3°C para solidificação da agarose por 20 minutos. Após este tempo, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de lise por 2h a 3°C.

Depois da lise, as lâminas foram acomodadas em uma cuba de eletroforese e cobertas com solução tampão. A corrida ocorreu por 20 minutos a 4°C com 300mA e 25V. Após isto, as lâminas foram retiradas e cobertas com solução de neutralização por 5 minutos, em três repetições. As lâminas foram fixadas em álcool etílico por 10 minutos e deixadas para secarem 24 horas em refrigerador a 4°C.

As lâminas foram coradas com 100µL de brometo de etídio e analisadas em microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. A leitura das lâminas se deu de forma aleatória no teste a cego. Foram observadas 100 células por animal e os danos no DNA, na qual foram classificados em classe 0, sem dano; classe 1, cauda com até o diâmetro da cabeça do cometa; classe 2, cauda tamanho médio, com duas vezes o tamanho da cabeça e classe 3, cauda longa, comprimento superior a 2 vezes o tamanho da cabeça (Fig. 3a, b, c, e ed, respectivamente). Após as leituras, foram calculados o índice de danos e frequência de danos de cada animal. O índice de danos é a extensão e severidade do dano observado nas células. Já a frequência de dano, mostrou a quantidade de células que possuem algum tipo de dano.

## 2.7. Teste SMART

Para o teste SMART, foram selecionadas 400 fêmeas virgens das linhagens *flr<sup>3</sup>* (Flare3) e ORR, as quais foram cruzadas com 200 machos da linhagem *mwh*, por um período de 48 horas. Posteriormente, os casais foram transferidos para frascos de cultura contendo uma base sólida de ágar-ágar, coberta por uma camada de fermento biológico (*S. cerevisiae*) suplementado com açúcar, onde foram coletados os ovos por um período de 8 horas. Após  $72 \pm 4$  horas, as larvas atingiram o 3º estágio de desenvolvimento e foram lavadas com água corrente e coletadas com auxílio de uma peneira de malha fina. Grupos de aproximadamente 100 larvas foram transferidos para tubos de vidro contendo 1,5g de meio de cultura alternativa (purê de batata instantâneo Yoki®) e 5,0 mL do óleo de *Pachira aquatica* nas concentrações de 2.5; 5.0 e 10mg/mL. Para o controle negativo foi utilizado água destilada, etanol a 3% e tween-80 a 1% e como controle positivo o cloridrato de doxorubicina na concentração de 0,125 mg/mL. Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh + / + flr<sup>3</sup>* (trans-heterozigoto marcado - MH) e *mwh + / + TM3, BdS* (heterozigoto balanceado - BH) foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram destacadas e montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure (30g de goma arábica, 50g de hidrato de cloral, 100 mL de água e 20 mL de glicerol) e analisadas quanto a ocorrência de diferentes tipos de manchas mutantes, em microscópios ópticos com magnificação de 400X.

## 2.7. Análise estatística

Todos os resultados foram expressos em média  $\pm$  erro padrão da média (SEM). Para análise dos resultados dos ensaios do cometa e micronúcleo, o teste

de análise de variância de uma via (one-way ANOVA) foi utilizado, seguido do teste *post hoc* de Tukey. O nível de significância foi considerado como  $p < 0,05$ . As análises estatísticas foram realizadas através do software GraphPad Prisma versão 5, para Windows.

Para análise do teste SMART foi empregado o teste Binomial Condicional,<sup>19</sup> com nível de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ . As frequências de cada tipo de mancha mutante por mosca foram comparadas com os respectivos controles negativos, possibilitando a caracterização dos resultados como positivos, fraco-positivos, negativos ou inconclusivos.<sup>20</sup> Na aplicação prática do método de decisão, além da hipótese nula, elabora-se uma hipótese alternativa específica, que requer uma frequência de mutação muitas vezes maior no tratado, do que a obtida no controle negativo.<sup>21</sup>

### **3. Resultados**

#### **3.1. Ensaio do micronúcleo**

No teste de micronúcleo foram analisadas as médias de frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MN-PCEs) e a relação entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCEs/NCEs) encontrados nos animais tratados de ambos os sexos.

Na figura 4a e 4b encontram-se as diferenças entre as médias de MN-PCEs entre todos os grupos testados de ambos os sexos. Os resultados demonstraram que os machos e fêmeas do controle positivo obtiveram valores estatisticamente maiores de MN-PCEs quando comparados aos grupos que receberam o OSPA (250, 500 e 1000 mg/kg/bw) ( $F_{\text{FÊMEAS}}(4,20) = 70,33$ ,  $p < 0,05$ ,



para ambos os grupos;  $F_{\text{MACHOS}}(4,20)=49.17$ ,  $p<0,05$ , para ambos os grupos) e ao grupo controle negativo. Entre os grupos de animais tratados e o grupo controle negativo não houve diferença estatística.

Os resultados estatísticos da relação entre os eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCEs/NCEs) revelaram que o tratamento com OSPA das três doses analisadas, tanto em fêmeas como em machos não causaram alterações significativas quando comparadas ao grupo controle negativo. No grupo controle positivo houve uma diminuição significativa na relação entre PCEs/NCEs quando comparados ao grupo controle negativo e todos os grupos tratados com OSPA ( $F_{\text{FÊMEAS}}(4,20)=249.4$ ,  $p<0,05$ , para ambos os grupos;  $F_{\text{MACHOS}}(4,20)=125.9$ ,  $p<0,05$ , para ambos os grupos), como esperado (Figura 5a e 5b).

### **3.2. Ensaio do cometa**

No ensaio de cometa, foi observado um aumento significativo referente ao índice de dano ao DNA do grupo controle positivo quando comparado ao grupo controle negativo e a todos os grupos experimentais 250, 500 e 1000 mg/kg/bw (tabela 2). Quanto à frequência de dano, as células injuriadas do grupo controle positivo obteve um aumento estatístico quando comparado ao grupo controle negativo e das doses analisadas do OSPA em fêmeas e machos.

Em relação ao índice como para frequência de dano, todas as doses analisadas do OSPA foram estatisticamente semelhantes aos animais do grupo controle negativo, demonstrando que não houve efeito genotóxico a partir da administração do OSPA.

### 3.3. Teste SMART

Em relação ao teste SMART, os grupos tratados com as três concentrações do OSPA apresentaram uma taxa de sobrevivência maior do que 80%, demonstrando atividade não tóxica deste óleo.

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos a partir das análises dos descendentes *mwh/fler3*, obtidos do cruzamento ST, tratados com o OSPA, seguindo o protocolo de genotoxicidade, sendo que foram avaliadas as concentrações de 2,5; 5,0 e 10,0 mg/mL. O controle negativo apresentou a frequência 0,30 em relação ao número total de manchas mutantes por indivíduo. Enquanto que no controle positivo (DXR), a frequência total de manchas foi de 11,05. Observa-se que o OSPA nas concentrações avaliadas apresentaram frequência de formação de clones por indivíduo, variando de 0,15 a 0,40, não diferindo estatisticamente do observado no controle negativo. Ainda, nos descendentes de *mwh/fler3* do cruzamento HB, apresentou frequência de manchas mutantes de 0,55 para o grupo controle negativo e de 7,45 para grupo controle positivo. Nas concentrações tratadas com o OSPA a frequência de manchas mutantes variou de 0,15 a 0,80, não diferindo estatisticamente do controle negativo.

## 4. Discussão

A utilização de plantas como fonte nutritiva tem crescido nos últimos anos devido ao aumento da população mundial na busca de um alimento de fácil acesso e na premissa equivocada que derivados de plantas possuem um menor índice de toxicidade. Ainda, a utilização dessas plantas em esquemas de farmacoterapia e na fabricação de cosméticos também está em ascensão em

virtude do baixo custo e abundância da maioria dessas plantas na natureza. Não obstante, algumas vezes, esses recursos são utilizados de forma precipitada e indiscriminada devida à falta de informações do seu potencial tóxico e doses seguras, o que torna a matéria-prima vegetal potencialmente perigosa, principalmente devido a ingestão de partes das plantas que são tóxicas mesmo em doses baixas.<sup>22</sup>

No presente estudo, um dos testes realizados para avaliação da genotoxicidade é o micronúcleo. O ensaio analisa a formação de uma pequena massa nuclear presente no citoplasma e delimitada por membrana separada do núcleo principal, facilmente identificável. Surgem em células filhas como consequência de uma reparação errônea ou de danos genéticos nas células parentais que não foram reparadas.<sup>23</sup> O teste do MN foi originalmente desenvolvido na detecção de danos cromossômicos e cromatídicos em eritrócitos da medula óssea de roedores, onde posteriormente foi padronizado em sangue periférico. O ensaio é realizado preferencialmente em eritrócitos policromáticos da medula óssea e do sangue periférico, onde estão em altas e constantes taxas de divisões celulares, por serem anucleados e diferenciados em eritrócitos policromáticos na presença de RNA. Na contagem do número de MN-PCEs se determina o potencial genotóxico, e a relação entre PCEs/NCEs se determina a citotoxicidade<sup>24, 25</sup>, sendo este um importante ensaio para a determinação de citotoxicidade e genotoxicidade de produtos preconizados pelas agências reguladoras nacionais e internacionais. Sendo assim, o óleo obtido a partir das sementes da *P. aquatica* não possui potencial mutagênico/clastogênico, sendo seguro o consumo para humanos, visto que o tratamento dos animais, nas diferentes concentrações testadas, não foi capaz de induzir a formação de

micronúcleos nas células da medula óssea (Figura 3a e 3b). Em relação aos animais tratados com ciclofosfamida, tanto machos como fêmeas demonstraram alta frequência de MN-PCEs quando comparados aos demais grupos analisados, como já era esperado. O aumento de MN-PCEs se relaciona ao aparecimento de neoplasias e tumores, e a baixa frequência de micronúcleos nos animais tratados com o OSPA demonstra a segurança durante o consumo.

A avaliação de citotoxicidade foi realizada no presente estudo através da análise entre a relação de PCEs/NCEs nas células da medula óssea de ratos. Compostos como ciclofosfamida causam efeitos clastogênicos e reduzem produção de eritrócitos jovens (policromáticos), sendo considerados citotóxicos.<sup>26</sup> Os resultados demonstraram que não houve diferença estatística na relação entre PCEs/NCEs dos grupos tratados com o OSPA quando comparados ao controle negativo (Figura 4a e 4b). Tais resultados indicam que o OSPA não é capaz de afetar a formação de novos eritrócitos e, portanto, não possui citotoxicidade nas condições testadas.

O ensaio cometa ou também conhecido como corrida de células únicas em gel de eletroforese (SCGE) é um método de detecção de possíveis danos nas cadeias de DNA, logo um teste genotóxico, já que as lesões acometidas não são permanentes e podem ser reparadas.<sup>17</sup> Foi introduzida pela primeira vez em 1984 por Östling e Johanson com o objetivo de buscar os possíveis danos sofridos no DNA de fita dupla em corrida de eletroforese sob pH neutro.<sup>28, 29</sup> O procedimento do teste é fundamentado na eletroforese de células em lise embebidas no gel de agarose, fazendo com que os fragmentos (danos cometidos no DNA) se afastem do seu núcleo principal, resultando em uma imagem com formato semelhante a um cometa, de onde surgiu o nome do teste.<sup>30</sup>

Na presente pesquisa, os resultados do ensaio do cometa corroboram com os achados do micronúcleo, não demonstrando efeitos genotóxicos nos ratos tratados com OSPA, em ambos os sexos e nas diferentes concentrações, visto que não houve diferença significativa no índice e frequência de danos ao DNA quando comparados aos animais do controle negativo (tabela 2).

Um dos testes realizados para avaliação da mutagenicidade foi o teste SMART. Este ensaio foi desenvolvido por Graf et al. (1984) e tem como fundamento a detecção e quantificação de manchas mutantes, que exibem a expressão fenotípica de lesões ocorridas em nível de DNA nas células dos discos imaginais das asas da mosca. As alterações genéticas detectadas pelo SMART incluem mutações pontuais, mutações cromossômicas e/ou recombinação mitótica, as quais levam a perda da heterozigose de dois genes marcadores *mwh* e *flr<sup>3</sup>*, envolvidos na formação dos pelos das asas do indivíduo adulto.<sup>31</sup>

Os resultados do teste de SMART da presente pesquisa, indicam que, nas concentrações avaliadas, o OSPA não foi capaz de induzir alterações nas sequências do DNA ou alterações na estrutura dos cromossomos. Como esperado, os descendentes do cruzamento ST, bem como nos descendentes do cruzamento HB, obtiveram maior repetição de manchas mutantes no grupo controle positivo (tratado com doxorrubicina) do que quando comparado ao grupo controle negativo (tratado com veículo). Os descendentes do cruzamento HB apresentam altos níveis citocromo P450, com elevada capacidade de metabolização de agentes químicos (xenobióticos), biossíntese de vitaminas, lipídios e outros metabolitos naturais das células, relatando a importância do ensaio empregado neste estudo.<sup>32</sup> Os grupos que receberam o OSPA não apresentaram diferença estatística quando comparados ao controle negativo,

esses resultados permitem concluir que as enzimas do citocromo P450 não interferem no potencial genotóxico, sugerindo a ausência de genotoxicidade a partir dos tratamentos realizados.

Inúmeras plantas utilizadas como alimento e/ou medicamento vêm sendo avaliadas quanto a segurança pré-clínica durante o consumo tendo demonstrando ausência de genotoxicidade como, por exemplo, a *Attalea phalerata*,<sup>33</sup> *Caryocar brasiliense*,<sup>34</sup> *Campomanesia pubescens*,<sup>3</sup> entre outras. No entanto, algumas plantas demonstraram efeitos genotóxicos e citotóxicos e seu uso deve ser evitado, como é o caso da *Meyna spinosa*, *Oroxylum indicum*, *Baccharis trinervis* e *Euphorbia hyssopifolia* L.<sup>35-37</sup> Esses dados reafirmam a importância e a necessidade destes estudos.

## 5. Conclusão

Nas condições analisadas, o óleo da semente da *P. aquatica*, quando utilizada por gavagem, não mostrou resultados aneugênicos/clastogênicos em células de medula óssea nem efeito genotóxico em célula de sangue periférico de roedores tratados por 28 dias nas doses de 250, 500 e 1000 mg/Kg. Os metabólitos de biotransformação do OSPA não apresentaram atividade genotóxica, como demonstrado pelo teste SMART nos descendentes do cruzamento de alta bioativação. Sendo assim, os resultados desta pesquisa indicam a segurança no consumo do óleo desta planta.

## Conflict of interests

The authors declare that there are no conflicts of interest.

## Acknowledgments

To the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), to the Foundation for Support to the Development of Education, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul (FUNDECT) for granting the scholarship (Protocol No. 59 / 300.559 / 2016).

## 5. Referências Bibliográficas

- 1 J. Neuza, LDM Moreno. Caracterização do óleo das sementes de *Pachira aquatica* Aublet para aproveitamento alimentar, *Acta Amazonica*, 2012, **42**, 149-156.
- 2 JTA Oliveira, IM Vasconcelos, LCNM Bezerra, SB Silveira, ACO Monteiro, RA Moreira. Composition and nutritional properties of seeds from *Pachira aquatica* Aubl, *Sterculia striata* St Hil et Naud and *Terminalia catappa* Linn, *Food Chemistry*, 2000, **70**, 185-191.
- 3 GRV Boas, FHS Araújo, JM Marcelino, LHA Castro, APS Silveira, RS Nacer, FR Souza, CAL Cardoso, RB Lacerda, ZR Guterres, SA Oesterreich. Preclinical safety evaluation of the ethanolic extract from *Campomanesia pubescens* (Mart. ex DC.) O. BERG (guavira) fruits: analysis of genotoxicity and clastogenic effects, *Food Function.*, 2018, **9**, 3707-17.
- 4 The Angiosperm Phylogeny G. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG II. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 2003, **141**, 399-436.
- 5 BDLDA Silva, CCD Azevedo, FDLAA Azevedo. Propriedades funcionais das proteínas de amêndoas da munguba (*Pachira aquatica* Aubl.), *Revista Brasileira de Fruticultura*, 2015, **37**, 193-200.
- 6 KB Silva, E. Alves, VP Matos, AB Lucena. Caracterização morfológica de frutos, sementes e fases da germinação de *Pachira aquatica* Aubl. (Bombacaceae), *Semina: Ciências Agrárias*, 2012, 891-898.
- 7 Francielli de Oliveira P, Furtado RA, Acesio NO, Leandro LF, Montanheiro G, de Padua FC, et al. In vivo protective activity of *Styrax camporum* hydroalcoholic extract against genotoxicity induced by doxorubicin and methyl methanesulfonate in the micronucleus and comet assays, *Planta medica*, 2012, **78**, 1899-905.
- 8 EM Kuskoski, AG Asuero, MT Morales, R. Fett. Frutos tropicais silvestres e polpas de frutas congeladas: atividade antioxidante, polifenóis e antocianinas, *Ciência Rural*, 2006, **36**, 1283-7.
- 9 SK Berry. Cyclopropene fatty acids in some Malaysian edible seeds and nuts: I. Durian (*Durio zibethinus*, Murr.). *Lipids.*, 1980, **15**, 452-5.
- 10 MH Chaves, AS Barbosa, JMM Neto, S Aued-Pimentel, JHG Lago. Caracterização química do óleo da amêndoa de *Sterculia striata* St. Hil. et Naud. *Química Nova*. 2004, **27**, 404-8.

- 11 B. Annangi, S. Bonassi, R. Marcos, A. Hernández. Biomonitoring of humans exposed to arsenic, chromium, nickel, vanadium, and complex mixtures of metals by using the micronucleus test in lymphocytes. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016, 770, 140-61.
- 12 A. Nersesyán, M. Fenech, C. Bolognesi, M. Mišík, T. Setayesh, G. Wultsch, et al. Use of the lymphocyte cytokinesis-block micronucleus assay in occupational biomonitoring of genome damage caused by in vivo exposure to chemical genotoxins: Past, present and future. *Mutation Research/Reviews in Mutation Research*. 2016, 770, 1-11.
- 13 EA Varanda, GL Pozetti, MV Lourenço, W Vilegas, MSG Raddi. Genotoxicity of *Brosimum gaudichaudii* measured by the Salmonella/microsome assay and chromosomal aberrations in CHO cells, *Journal of ethnopharmacology*. 2002, **81**, 257-64.
- 14 DC Lázaro, YI López, AIF Vázquez, AD Odio, JE González, LM Sánchez, NG Delgado. Genotoxic assessment of aqueous extract of *Rhizophora mangle* L.(mangle rojo) by spermatozoa head assay, *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 2010, **15**,0.
- 15 ER Carmona, AG Rodríguez, R. Marcos. Genotoxicity of Copper and Nickel Nanoparticles in Somatic Cells of *Drosophila melanogaster*, *Journal of Toxicolog.*, 2018, **2018**, 8.
- 16 M. Llana-Ruiz-Cabello, M. Puerto, S. Maisanaba, R. Guzman-Guillen, S. Pichardo, AM Camean. Use of micronucleus and comet assay to evaluate evaluate the genotoxicity of oregano essential oil (*Origanum vulgare* L. *Virens*) in rats orally exposed for 90 days. *Journal of toxicology and environmental health, Part A*. 2018, **81**, 525-33.
- 17 OECD, *Oecd Guideline for the testing of chemicals. Test No. 489: In Vivo Mammalian Alkaline Comet Assay*, Paris, 2016.
- 18 OECD, *Oecd Guideline for the testing of chemicals. Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test*, Paris, 2016.
- 19 MA Kastenbaum, KO Bowman. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies, *Mutation research*, 1970, **9**, 527-49.
- 20 H. Frei, FE Wurgler. Statistical methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative, or inconclusive result, *Mutation research*, 1988, **203**, 297-308.
- 21 H. Frei, FE Wurgler. Optimal experimental design and sample size for the statistical evaluation of data from somatic mutation and recombination tests (SMART) in *Drosophila*, *Mutation research*, 1995, **334**, 247-58.
- 22 E. Farsi, A. Shafaei, SY Hor, MBK Ahamed, MF Yam, MZ Asmawi, et al. Genotoxicity and acute and subchronic toxicity studies of a standardized methanolic extract of *Ficus deltoidea* leaves, *Clinics.*, 2013, **68**, 865-75.
- 23 ACG Figueira. Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica e mutagênica/antimutagênica do óleo essencial da *Lantana camara* (Cambará), *Programa de Pós-Graduação stricto sensu em Genética*, Pontifícia Universidade Católica de Goiás, 2017.
- 24 WN Choy. Regulatory genetic toxicology tests. Genetic toxicology and cancer risk assessment, *CRC Press*, 2001, 107-28.



- 25 PM Terrazas. Estudo do potencial genotóxico da Gutiferona A em diferentes células de camundongos in vitro, *Programa de Pós-Graduação em biologia geral e aplicada*, Universidade Estadual Paulista de Mesquita Filho, 2013.
- 26 BB Gollapudi, LG McFadden. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation research*, 1995, **347**, 97-9.
- 27 LG McFadden, BB Gollapudi. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test, *Mutation research Letters*, 1995, **347**, 97-9.
- 28 O. Ostling, KJ Johanson. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells, *Biochemical and biophysical research communications*, 1984, **123**, 291-8.
- 29 NP Singh, MT McCoy, RR Tice, EL Schneider. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells, *Experimental cell research*, 1988, **175**, 184-91.
- 30 M. Klaude, S. Eriksson, J. Nygren, G. Ahnstrom. The comet assay: mechanisms and technical considerations, *Mutation research*, 1996, **363**, 89-96.
- 31 U. Graf, FE Wurgler, AJ Katz, H. Frei, H. Juon, CB Hall, PG Kale. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*, *Environmental mutagenesis*, 1984, **6**, 153-88.
- 32 A. Chefson, K. Auclair. Progress towards the easier use of P450 enzymes, *Molecular BioSystems*, 2006, **2**, 462-469.
- 33 FF de Lima, SELT Menegati, GK Traesel, FHS de Araújo, CH Lescano, SM Peixoto, FAM Silva, SCH Vieira, MC Vieira, SA Oesterreich. Study on the cytotoxic, genotoxic and clastogenic potential of *Attalea phalerata* Mart. Ex Spreng. Oil pulp in vitro and in vivo experimental models, *PloS one*, 2016, **11**, 1-11.
- 34 GK Traesel, FHS de Araújo, LHA Castro, FF de Lima, SELT Menegati, PN Justi, CAL Kassuya, CAL Cardoso, EJS Argandoña, SA Oesterreich. Safety Assessment of Oil from Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.): Evaluation of the Potential Genotoxic and Clastogenic Effects, *Journal of medicinal food*, 2017, **20**, 804-11.
- 35 SS Araujo, TC Fernandes, YT Cardona, PM Almeida, MA Marin-Morales, AV Dos Santos, KP Randau, AM Benko-Iseppon, AC Brasileiro-Vidal. Cytotoxic and genotoxic effects of ethanolic extract of *Euphorbia hyssopifolia* L. on HepG2 cells, *Journal of ethnopharmacology*, 2015, **170**, 16-9.
- 36 V. Jaramillo-Garcia, C. Trindade, E. Lima, TN Guecheva, I. Villela, W. Martinez-Lopez, DS Correa, ABF Ferraz, S. Moura, MQ Sosa, J da Silva, JAP Henriques. Chemical characterization and cytotoxic, genotoxic, and mutagenic properties of *Baccharis trinervis* (Lam, Persoon) from Colombia and Brazil, *Journal of ethnopharmacology*, 2018, **213**, 210-20.
- 37 S. Singh, P. Chattopadhyay, SK Borthakur, R. Policegoudra. Safety Profile Investigations of *Meyna spinosa* (Roxb.) and *Oroxylum indicum* (Linn.) Extracts Collected from Northeast India, *Pharmacognosy magazine*, 2018, **13**, 762.

## Tabelas

Tabela 1. Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes de *D. melanogaster* do cruzamento padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratados com o óleo de *Pachira aquatica*

Genótipos e tratamentos (mg/mL)	Nº. de moscas (N)	Manchas por indivíduo (nº. manchas) diagnóstico estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>m</i> = 2	Total Manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup>
		Pequenas manchas únicas (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	Grandes manchas únicas (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	Manchas gêmeas <i>m</i> = 5	Total manchas <i>m</i> = 2		
<i>mwh/flr</i> <sup>3</sup>							
<b>ST</b>							
CN	20	0,30 (06)	0,00 (00)	0,00 (00)	0,30 (06)	06	
DXR	20	4,85 (97) +	3,05 (61) +	3,15 (63) +	11,05 (221) +	217	
OSPA 2,5	20	0,40 (08) -	0,00 (00) -	0,00 (00) -	0,40 (08) -	08	
OSPA 5,0	20	0,30 (06) -	0,05 (01) -	0,00 (00) -	0,35 (07) -	07	
OSPA 10,0	20	0,15 (03) -	0,00 (00) -	0,00 (00) -	0,15 (03) -	03	
<b>HB</b>							
CN	20	0,30 (06)	0,15 (03)	0,10 (02)	0,55 (11)	11	
DXR	20	2,65 (53) +	3,10 (62) +	1,70 (34) +	7,45 (149) +	147	
OSPA 2,5	20	0,10 (02) -	0,05 (01) -	0,00 (00) -	0,15 (03) -	03	
OSPA 5,0	20	0,40 (08) -	0,10 (02) -	0,00 (00) -	0,50 (10) -	10	
OSPA 10,0	20	0,75 (15) +	0,05 (01) -	0,00 (00) -	0,80 (16) i	16	

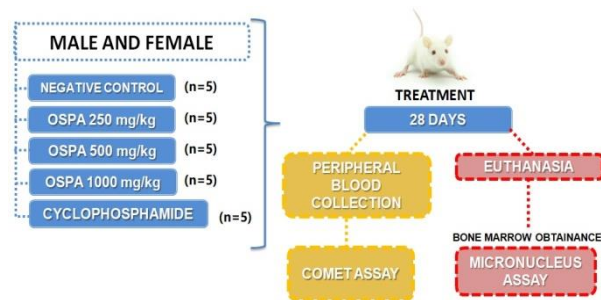
<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo (cloridrato de doxorubicina); -, negativo; i, inconclusivo; m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $\alpha = \beta = 0,05$ ; <sup>b</sup>Incluindo manchas simples *flr*<sup>3</sup>raras; <sup>c</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas.

**Table 2.** Efeitos do tratamento com óleo da semente de *Pachira aquatica* sobre índice e frequência de danos no DNA utilizando o sangue periférico de ratos *Wistar*

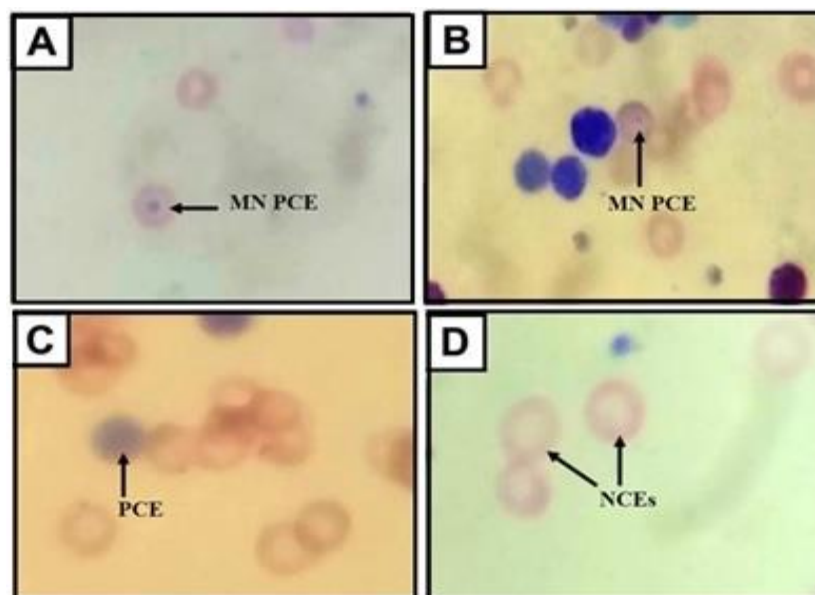
Grupos	Células injuriadas	Classes de danos				Score
		0	1	2	3	
<b>Fêmeas</b>						
Controle Negativo	2,00±1,05 <sup>a</sup>	98,00±1,05	2,00±1,05	0,00±0,00	0,00±0,00	2,00±1,05 <sup>a</sup>
Ciclofosfamida (CP)	70,60 ±3,22 <sup>b</sup>	29,40±3,22	37,80±1,93	27,80±3,99	5,00±2,41	108,40±4,35 <sup>b</sup>
250 mg/kg	5,40±1,53 <sup>a</sup>	94,60±1,53	2,80±0,73	1,80±0,66	0,80±0,049	8,80±2,95 <sup>a</sup>
500 mg/kg	5,20±1,35 <sup>a</sup>	94,80±1,35	4,20±1,49	0,80±0,20	0,20±0,20	6,40±1,29 <sup>a</sup>
1000 mg/kg	6,60±1,50 <sup>a</sup>	93,40±1,50	4,60±1,40	1,80±0,91	0,20±0,20	8,80±1,98 <sup>a</sup>
<b>Machos</b>						
Controle Negativo	1,80±0,37 <sup>a</sup>	98,20±0,37	1,60±0,51	0,20±0,20	0,00±0,00	2,00±0,31 <sup>a</sup>
Ciclofosfamida (CP)	70,80 ±3,55 <sup>b</sup>	29,20±3,55	37,80±1,96	28,60±3,67	4,40±2,34	108,20 ±6,90 <sup>b</sup>
250 mg/kg	3,00±0,71 <sup>a</sup>	97,00±0,71	2,80±0,86	0,20±0,20	0,00±0,00	3,20±0,58 <sup>a</sup>
500 mg/kg	5,00±0,84 <sup>a</sup>	95,00±0,84	3,20±0,97	1,60±0,51	0,20±0,20	7,00±1,26 <sup>a</sup>
1000 mg/kg	5,40±1,21 <sup>a</sup>	94,40±1,21	4,40±1,25	0,40±0,25	0,60±0,40	7,00±1,51 <sup>a</sup>

Dados expressos como média ± EPM total de células lesadas e frequência média entre diferentes classes para o teste genotóxico. Letras diferentes indicam diferenças estatisticamente significantes entre os grupos ( $p < 0,05$ ); ANOVA / Tukey.

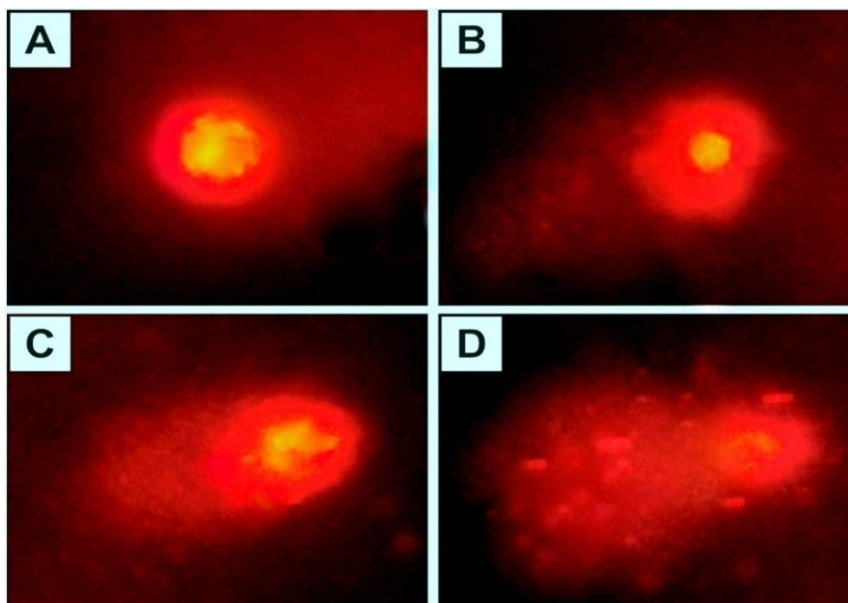
## FIGURAS



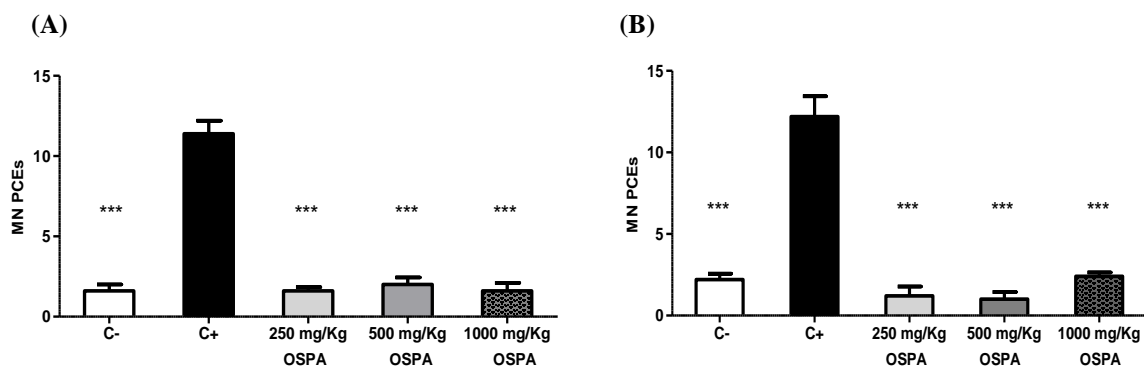
**Fig. 1** Fluxograma do esquema experimental utilizado no ensaio do micronúcleo e cometa.



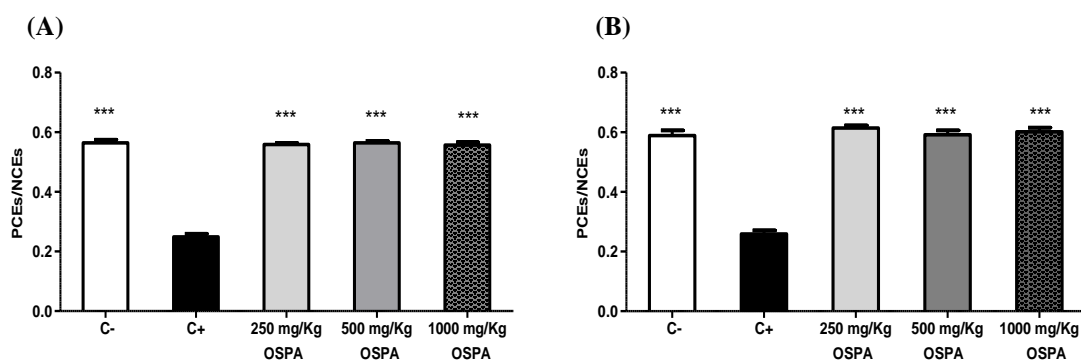
**Fig. 2** Eritrócitos da medula óssea de ratos *Wistar*. (A e B) Eritrócitos policromática micronucleados (MN-PCE); (C) eritrócito policromático (PCE) e (D) Eritrócitos normocromáticos (NCEs).



**Fig. 3** Classe de cometas de células do sangue periférico. (A) Classe 0 (sem danos); (B) classe 1 (cauda com até o diâmetro da cabeça do cometa); (C) classe 2 (cauda tamanho médio, com duas vezes o diâmetro da cabeça); e (D) classe 3 (cauda longa maior que o dobro do tamanho da cabeça). Amostra de animal do grupo de controle positivo.



**Fig. 4** Resultados do tratamento do OSPA e do controle positivo (ciclofosfamida) nas contagens de MN-PCEs usando a medula óssea de fêmeas (A) e machos (B) em ratos *Wistar*. Dados expressos como médias  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) do número de MN-PCEs no ensaio de micronúcleos. \*\*\* Diferencia do grupo controle positivo,  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey,). Um total de 2000 células foram analisadas em cada animal. MN-PCEs, eritrócitos policromáticas micronucleadas.



**Fig. 5** Resultados do tratamento do OSPA e do controle positivo (ciclofosfamida) na relação entre PCEs / NCEs a partir da medula óssea de fêmeas (A) e macho (B) de ratos *Wistar*. Dados expressos como média  $\pm$  SEM ( $n = 5$ ) da razão PCEs / NCEs no ensaio de micronúcleos. \*\*\* Diferencia o grupo de controle positivo;  $p < 0,05$  (one-way ANOVA, seguido pelo pós teste de Tukey). Um total de 200 células foram analisadas em cada animal. PCEs / NCEs, policromáticos para eritrócitos normocromáticos

## 6. CONCLUSÕES

### 6.1. Geral

O óleo da semente de *Pachira aquatica* Aublet não apresentou potencial de toxicidade pré-clínica em ratos *Wistar*.

### 6.2. Específicas

O estudo químico do OSPA relatou presença do ácido palmítico, ácido oleico e o ácido linoleico como predominantes.

Após exposição oral aguda, o OSPA demonstrou baixa toxicidade, ausência de mortes ou mudanças comportamentais.

A DL50 estimada para o OSPA é maior que 2000 mg/kg;

De acordo com os dados da química clínica e histopatológicos não houve toxicidade sistêmica relevante no teste de toxicidade a curto prazo. No entanto, foram encontradas algumas alterações nos níveis de creatina, aspartato aminotransferase, glicemia, porém dentro dos valores de referência normais para a espécie, indicando baixa toxicidade nas condições experimentais adotadas.

Os resultados fornecem as primeiras evidências de que o OSPA quando administrado por via oral (gavagem) não é genotóxico para as células de sangue periférico e não possui ação clastogênica/aneugênica em células de medula óssea dos ratos. Ainda o óleo não apresentou atividade genotóxica, como demonstrado pelo teste SMART nos descendentes do cruzamento de alta bioativação.

## **7 ANEXOS**



## 7.1 PARECER DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA



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, 22 de agosto de 2016.

#### CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da toxicidade, citotoxicidade, genotoxicidade e efeito central do óleo da semente de *Pachira aquatica Aublet***", registrada sob o protocolo de nº 38/2016, sob a responsabilidade de *Silvia Aparecida Oesterreich e Jhony Moreira Marcelino* – 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 aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/UFGD) da Universidade Federal da Grande Dourados, em reunião de 12/08/2016.

<i>Finalidade</i>	( X ) Ensino ( ) Pesquisa Científica
<i>Vigência da autorização</i>	10/10/2016 a 10/10/2017
<i>Espécie/linhagem/raça</i>	<i>Rattus norvegicus/ Wistar</i>
<i>Nº de animais</i>	150
<i>Peso/idade</i>	50 dias
<i>Sexo</i>	105 machos e 45 fêmeas
<i>Origem</i>	Biotério Central da 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