



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO  
CENTRO DE BIOCÊNCIAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS



PEDRO THIAGO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA TOXICOLÓGICA DO ÓLEO FIXO DAS  
AMÊNDOAS DE *Syagrus schizophylla* (MART.) GLASSMAN**

Recife  
2023

PEDRO THIAGO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA TOXICOLÓGICA DO ÓLEO FIXO DAS  
AMÊNDOAS DE *Syagrus schizophylla* (MART.) GLASSMAN**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Pernambuco, como  
requisito para obtenção do título de  
mestre em Ciências Biológicas

Área de concentração: Sistemas  
Biológicos

Orientador (a): Dra. Márcia Vanusa da Silva

Coorientador (a): Dr. Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior

Recife

2023

Catálogo na Fonte:  
Bibliotecária Natália Nascimento, CRB4/1743

Silva, Pedro Thiago da.

Avaliação da segurança toxicológica do óleo fixo das amêndoas de *syagrus schizophylla* (mart.) glassman. / Pedro Thiago da Silva. – 2023.

73 f. : il., fig.; tab.

Orientadora: Márcia Vanusa da Silva.

Coorientador: Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-graduação em Ciências biológicas, 2023.

Inclui referências.

1. Toxicidade aguda. 2. Genotoxicidade - produtos naturais. 3. *S. schizophylla*. I. Silva, Márcia Vanusa da. (orient.). II. Aguiar Júnior, Francisco Carlos Amanajás de. (coorient.). III. Título.

587

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2023-081

PEDRO THIAGO DA SILVA

**AVALIAÇÃO DA SEGURANÇA TOXICOLÓGICA DO ÓLEO FIXO DAS  
AMÊNDOAS DE *Syagrus schizophylla* (MART.) GLASSMAN**

Dissertação apresentada ao  
Programa de Pós-Graduação em  
Ciências Biológicas da Universidade  
Federal de Pernambuco, como  
requisito para obtenção do título de  
mestre em Ciências Biológicas.

Aprovada em: 01/03/2023

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Vanusa da Silva (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Tereza Dos Santos Correia (Examinadora Interna)  
Universidade Federal de Pernambuco

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Talita Giselly Dos Santos Souza (Examinadora Externa)  
Centro Universitário Facol

## AGRADECIMENTOS

Aqui expresso a minha eterna gratidão a todos que contribuíram direta e indiretamente à construção desse trabalho. Cada gesto de compreensão, cada palavra de conforto, cada conselho, serviu de base para me manter forte e consciente do meu papel quanto mestrando do Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Pernambuco.

A concretização dessa pesquisa é fruto de um trabalho em equipe, de horas, dias, meses de dedicação, mas nada seria possível sem a ajuda principalmente dos meus orientadores: Professora Márcia Vanusa e o professor Francisco Amanajás. Muito obrigado pelo tempo, dedicação e paciência que tiveram comigo. Um muito obrigado aos meus amigos Lucas Alcântara e Maria Nayara, pelo auxílio que me deram durante todo esse processo. Obrigado ao professor Cristiano Aparecido, Talita Giselly, Ruan Souza, Marlllyn Marques, Wendeo Kennedy, professora Noêmia Pereira, professora Daniela Navarro, Fábio Henrique, professora Maria Tereza e Katharina Marques, pelo tempo dedicado ao enriquecimento científico através das colaborações.

Não poderia deixar de agradecer ao Centro Acadêmico da Vitória (CAV), por ter aberto as portas, exposto um leque de oportunidades e dessa forma contribuindo para tornar tudo isso possível. Aqui estou, eternizando um momento que ficará marcado na minha vida, não pelo título, mas pelo caminho percorrido para chegar até aqui.

Obrigado a toda a equipe que compõe o Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas (PPGCB), programa esse que possibilitou a construção e andamento desse projeto. Ao projeto cadeia produtiva do licuri, ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico CNPq, ao MCTI e muito obrigado a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) na qual fui contemplado com a bolsa que me auxiliou financeiramente, pois sem esse recurso não teria possibilidade de concluir o curso e conseguir o diploma de mestre.

E, por último, obrigado a minha família, Pais e irmãos, mas especialmente a minha mãe Maria e minha irmã Geanne, que conhecem de forma mais íntima o caminho que percorri durante esses dois anos de mestrado.

“Deverá abrir os olhos ao eflúvio benéfico e construtivo dos novos conhecimentos, destinados a iluminar a vida e libertá-la da opressiva escravidão em que foi submergida pelo bloqueio dos velhos conceitos”.  
(PECOTCHE, 2013, p. 24).

## RESUMO

Objetivou-se investigar parâmetros relacionados a toxicidade do óleo fixo das amêndoas de *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman (OAS). O perfil lipídico do OAS foi elucidado por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de Massas (GC-MS) e posteriormente foram realizados ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares de Adenocarcinoma Humano da Glândula Mamária (MDB-MB-231) e macrófagos (J744A.1) com o uso de concentrações de 12.5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL do OAS. Ensaio de toxicidade oral aguda, genotoxicidade e mutagenicidade por teste micronúcleo e ensaio cometa em camundongos tratados com 2000 mg/kg do óleo por via oral (V.O). Para a toxicidade oral aguda os animais foram observados quanto ao comportamento, peso corpóreo, consumo de ração, análise bioquímica do sangue, peso de órgãos e avaliações macroscópicas e microscópicas desses órgãos. As análises estatísticas dos dados coletados foram feitas considerando a média e desvio padrão dos valores, adotando o nível de significância de  $P \leq 0,05$ . No geral o OAS não apresentou citotoxicidade às linhagens celulares, exceto para a concentração de 200 µg/mL na qual causou citotoxicidade apenas aos macrófagos. No que diz respeito à genotoxicidade, não se verificaram alterações nas frequências de eritrócitos policromáticos para o teste micronúcleo, bem como também não houve alteração nas frequências de danos e índices de danos em células sanguíneas nucleadas. Já para a toxicidade oral aguda não houve alterações comportamentais dos animais tratados com o óleo, não se verificaram alterações no consumo de ração e na variação do peso dos animais durante os 14 dias de observação. A bioquímica do sangue não diferiu significativamente ao comparar GCN com GOSs e não foram vistas alterações nos pesos do fígado, rim e baço, bem como não foram observadas alterações patológicas quando os órgãos foram submetidos a análise macroscópica e microscópica. Esse estudo traz informações relevantes à luz do método científico quanto a alguns aspectos relacionados a segurança no uso do OAS e constitui uma base para futuras pesquisas relacionadas à elucidação do seu perfil toxicológico.

**Palavras-Chave:** Toxicidade aguda. Genotoxicidade. Produtos naturais. *S. schizophylla*.

## ABSTRACT

The objective was to investigate parameters related to the toxicity of the fixed oil from *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman (OAS) almonds. The lipid profile of OAS was elucidated by gas chromatography coupled to mass spectrometry (GC-MS) and then cytotoxicity assays were performed on human mammary gland adenocarcinoma (MDA-MB-231) and macrophage (J774A.1) cell lines using concentrations of 12.5, 25, 50, 100 and 200 µg/mL of OAS. Acute oral toxicity, genotoxicity and mutagenicity assays by micronucleus test and comet assay in mice treated with 2000 mg/kg of the oil orally (O.V.). For acute oral toxicity, the animals were observed for behavior, body weight, feed consumption, blood biochemical analysis, organ weights, and macroscopic and microscopic evaluations of these organs. Statistical analyses of the collected data were performed considering the mean and standard deviation of the values, adopting the significance level of  $P \leq 0.05$ . Overall, OAS did not show cytotoxicity to cell lines, except for the concentration of 200 µg/mL in which it caused cytotoxicity only to macrophages. Regarding genotoxicity, there were no changes in the frequencies of polychromatic erythrocytes for the micronucleus test, as well as no changes in the frequencies of damage and damage index in nucleated blood cells. For acute oral toxicity, there were no behavioral changes in the animals treated with the oil, no changes in feed consumption, and no changes in weight variation of the animals during the 14 days of observation. Blood biochemistry did not differ significantly when comparing GCN with GOSs and no changes were seen in the weights of liver, kidney and spleen, as well as no pathological changes were observed when the organs were subjected to macroscopic and microscopic analysis. This study brings relevant information in the light of the scientific method regarding some aspects related to safety in the use of OAS and constitutes a basis for future research related to the elucidation of its toxicological profile.

**Key-words:** Acute toxicity. Genotoxicity. Natural products. *S. schizophylla*.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 –	Imagens contendo os limites da Mata Atlântica.	16
Figura 2 –	Imagem de espécies de palmeira <i>S. schizophylla</i>	21
Figura 3 –	Estrutura molecular de um ácido graxo.	24
Figura 4 –	Imagem evidenciando o processo de redução do MTT à cristais de formazano.	28
Gráfico 1 –	Análises da citotoxicidade em linhagens celulares de Adenocarcinoma Humano (MDA-MB-231 e Macrófagos J774A.1) expostas a diferentes concentrações do OAS por 24h.	46
Gráfico 2 –	Avaliação do perfil genotóxico do OAS (200 mg/kg) V.O. Ensaio cometa 6h e teste micronúcleo 48h.	48

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Quantificação dos ácidos graxos presentes na amostra de óleo vegetal das amêndoas de <i>S. schizophylla</i> .	46
Tabela 2 –	Dados referentes a variação de peso e consumo de ração dos animais durante 14 dias após tratados com o óleo das amêndoas de <i>S. schizophylla</i>	49
Tabela 3 –	Dados referentes ao peso relativo dos órgãos retirados dos camundongos tratados durante 14 dias com o óleo das amêndoas de <i>S. schizophylla</i>	49
Tabela 4 –	Análise bioquímica do sangue de camundongos tratados com o óleo das amêndoas de <i>S. schizophylla</i> na dosagem de 2000 mg/kg	50
Tabela 5 –	Histomorfometria de órgãos retirados dos camundongos tratados durante 14 dias com óleo das amêndoas de <i>S. schizophylla</i>	50

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Abs	Absorbância
AG	Ácido Graxo
AGCL	Ácido Graxo de Cadeia Longa
AGCM	Ácido Graxo de Cadeia Média
AL	Ácido Láurico
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCRJ	Banco de Células do Rio de Janeiro
CAV	Centro Acadêmico de Vitória
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Ensaio Cometa
EPCCs	Eritrócitos Policromáticos
FD	Frequência de Dano
GCN	Grupo Controle Negativo
GCP	Grupo Controle Positivo
GOSs	Grupo Tratado com o Óleo das Amêndoas de <i>S. schizophylla</i>
ID	Índice de Dano
ISO	International Organization for Standardization
OAS	Óleo das Amêndoas de <i>S. schizophylla</i>
OCDE	Organização para a Cooperação do Desenvolvimento Econômico
TMN	Teste Micronúcleo
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b>	<b>12</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS</b>	<b>14</b>
2.1	Objetivo Geral	14
2.2	Objetivos Específicos	14
<b>3</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA</b>	<b>15</b>
3.1	Aspectos Gerais o Bioma Mata Atlântica	15
3.1.2	Restinga	17
<b>3.1.3</b>	<b>Família <i>Arecaceae</i></b>	<b>19</b>
3.1.4	<i>Syagrus schizophylla</i> (Mart.) Glassman	20
3.3	Aspectos Toxicológicos dos Produtos Naturais	22
3.4	Ácidos Graxos	23
<b>3.4.1</b>	<b>Metabolismo dos Ácidos graxos</b>	<b>25</b>
3.5	Ensaio Não Clínicos	28
<b>3.5.1</b>	<b>Citotoxicidade</b>	<b>26</b>
3.5.2	Genotoxicidade e Mutagenicidade	28
3.5.3	Toxicidade oral aguda	31
4	Análises Estatísticas: Escolhendo o Teste Mais Adequado	33
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	<b>35</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES</b>	<b>60</b>
<b>7</b>	<b>SÚMULA CURRICULAR</b>	<b>61</b>
	<b>REFERÊNCIAS</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Ecologicamente o território brasileiro é dividido em seis biomas: Amazônia, Mata Atlântica, Cerrado, Caatinga, Pantanal e Pampa (AGUIAR *et al.*, 2016). A mata atlântica é um bioma de extrema relevância ambiental, pois além de comportar uma grande diversidade biológica de espécies vegetais e animais do Brasil e do mundo, possui um expressivo aporte de espécies endêmicas (INSTITUTO DE PESQUISAS JARDIM BOTÂNICO DO RIO DE JANEIRO, 2009). Nesse domínio fitogeográfico são encontradas diversas espécies de palmeiras, dentre elas a aricuriroba, de nome científico *S. schizophylla* (Mart.) Glassman (NOBLICK, 2019).

*S. schizophylla* pertence a família *Arecaceae*, sua localização é endêmica do Brasil, com ocorrência em áreas de restinga da mata atlântica e também na caatinga, amplamente distribuída e conhecida popularmente como: aricuriroba, aricuri, guriri, licuriroba (CNFlora, 2012). Sua estrutura morfológica comporta uma altura que varia entre 1-4 m x 10-15 cm, possui uma coroa densa, em suas folhas especificamente nos pecíolos apresentam dentes ou espinhos. Seus frutos são produzidos em grandes quantidades, possui cerca de 3 cm e coloração amarelo-avermelhado a alaranjado, o endosperma produz amêndoas de sabor amargo (NOBLICK, 2019).

As amêndoas produzidas por essa planta têm um alto valor calórico, podendo ser introduzida na alimentação da população, fato esse mostrado através da análise centesimal do óleo fixo das amêndoas onde o mesmo apresentou cerca de 70% de lipídeo (PADILHA *et al.*, 2017). Os ácidos graxos mais frequentemente encontrados em óleos de amêndoas de palmeiras do gênero *Syagrus* são: Ácido láurico, caprílico, cáprico, mirístico, sendo o ácido láurico com maior concentração e este apresenta alguns benefícios como: um potencial antimicrobiano, melhora o sistema imunológico e tem ação anti-inflamatória (NOZAKI *et al.*, 2012), porém estudos vêm mostrando que dosagens elevadas de ácidos graxos podem apresentar efeitos tóxicos ao organismo (YAGAWA *et al.*, 2018).

A utilização de plantas medicinais direcionadas ao tratamento de patologias, prevenção e cura é uma prática muito antiga da humanidade (JÚNIOR *et al.*, 2005; GOMEZ *et al.*, 2016). Contudo, há uma preocupação no que concerne ao uso inadequado desses produtos, carecendo assim de estudos que visem à sua administração de forma racional (SANTOS *et al.*, 2011). A agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) instituiu além de outros procedimentos de segurança

para o uso de compostos candidatos a fármacos, ensaios pré-clínicos, como uma forma de dar sustentação à futuras pesquisas de cunho clínico (ANVISA, 2013). Os fitofármacos são agentes promissores para o uso na terapêutica de diversas enfermidades, porém o uso irracional bem como a falta de informação sobre sua composição e segurança toxicológica pode inviabilizar a utilização (CASTILHO *et al.*, 2021).

Portanto é de fundamental importância o teste de segurança para o uso de plantas medicinais visto que a tradicionalidade da sua administração não garante a segurança como fitoterápico, sendo recomendada também além da avaliação da toxicidade oral aguda e subaguda a avaliação genotóxica para fitoterápicos de uso contínuo por humanos (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Devido à falta de padronização e controle das propriedades farmacológicas e tóxicas, há uma resistência na prescrição de fitoterápicos, sendo assim, a inserção dos mesmos na terapêutica médica será mais efetiva se obedecerem aos critérios de segurança, eficácia e qualidade, requisitos esses que também são preconizados para medicamentos de uso convencional (RATES, 2001; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010).

As palmeiras do gênero *Syagrus* têm uma ampla distribuição no território brasileiro e apresentam um forte potencial econômico e cultural, principalmente para grupos sociais que têm essas espécies como fonte de subsistência, tendo forte destaque também para o extrativismo e aproveitamento de seus fitoconstituintes. Porém não há na literatura estudos que mostrem os possíveis efeitos tóxicos do óleo fixo das amêndoas de *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman (OAS). Devido a necessidade de se obter cada vez mais substâncias com potencial farmacológico e observando que os produtos de origem natural têm se destacado como ótimos fármacos, essa pesquisa visou agregar informações sobre a segurança no uso do óleo das amêndoas de *S. schizophylla* através da avaliação dos parâmetros relacionados à sua citotoxicidade, toxicidade oral aguda, genotoxicidade e mutagenicidade.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil lipídico e os efeitos: citotóxico, genotóxico, mutagênico e a toxicidade oral aguda do OAS.

### 2.2 Objetivos Específicos

- Elucidar o perfil lipídico do OAS através da cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas (GC-MS);
- Avaliar a citotoxicidade das concentrações de 12.5, 25, 50, 100 e 200 µg/mL do OAS em linhagens celulares de macrófagos J774.A1 e Adenocarcinoma Humano da glândula mamária (MDA-MB-231);
- Avaliar a genotoxicidade e mutagenicidade em células de sangue periférico de camundongos tratados com OAS por via oral através de teste micronúcleo e ensaio cometa;
- Identificar efeitos tóxicos do OAS através da análise comportamental e análise bioquímica do sangue de camundongos;
- Investigar a toxicidade oral aguda do OAS através de características macroscópicas e histomorfométricas do fígado, baço e rins de camundongos.

### 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

#### 3.1 Aspectos Gerais do Bioma Mata Atlântica

Conceituar o que é bioma exige reconhecer diversas características ambientais que variam desde a associação encontrada entre a fauna e a flora na região, até a aspectos climáticos, compartilhamento genético -que perpassa entre as espécies ao longo da evolução-, aspectos geomorfológicos e pedológicos, ou seja, bioma é uma associação entre vida vegetal e animal que vivem em locais com características similares de modo que ao longo da evolução tiveram uma história evolutiva compartilhada, o que resulta em um ambiente com características singulares diferenciando-se assim dos outros tipos de vegetações (IBGE, 2004).

A Mata Atlântica é considerada um hotspot no que diz respeito à biodiversidade e conservação (FAORO, *et al.*, 2010; WAGNER, 2021; PIFFER *et al.*, 2022). Por apresentar uma ampla variação latitudinal, longitudinal e altitudinal, comporta diferentes características fitofisionômicas, dessa forma, a sua constituição é bastante diversificada permitindo-a apresentar vários padrões de formações vegetais, tais como: florestas ambrófilas -que varia da densa à mista-, formações de florestas estacionais, ecótonos e restingas (MUYLAERT *et al.*, 2018).

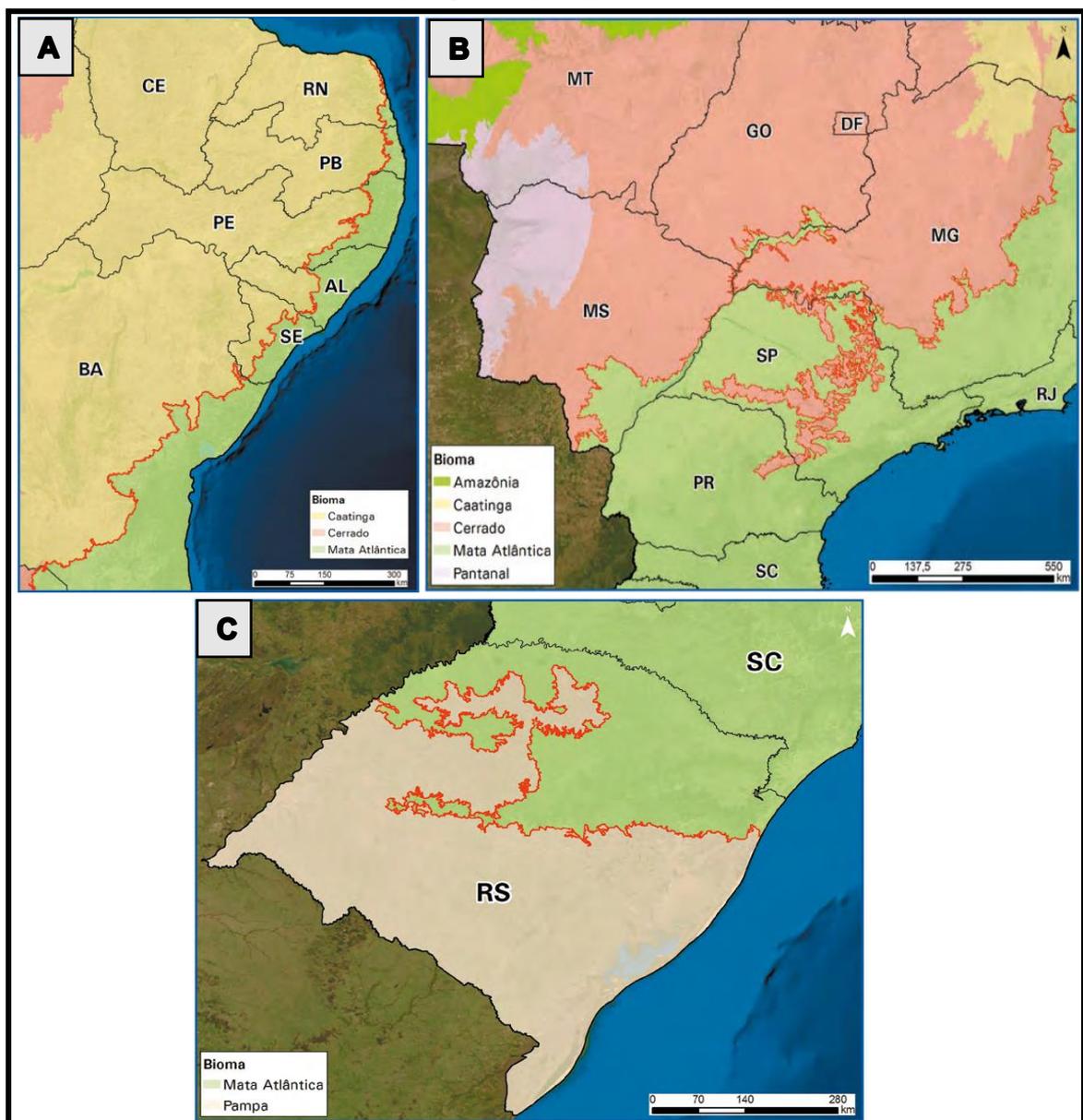
Delimitar territorialmente um bioma não é algo trivial, envolve uma série de fatores, que podem incluir: características climáticas, tipo de vegetação e até mesmo fatores políticos, sendo assim fica evidente que possam ocorrer variações no que diz respeito a sua delimitação (MUYLAERT *et al.*, 2018). Nesse estudo, a fim de abordar um limite territorial para o bioma Mata Atlântica, considerou-se os limites apresentados pelo IBGE (2019) que elaborou o Mapa de Biomas numa escala de 1:250 000 abordando as tipologias vegetacionais dominantes de cada ambiente como critérios para as delimitações dos biomas. Sendo assim foram estabelecidos três limites para a Mata atlântica, são eles: Os limites Caatinga-Mata Atlântica, Mata Atlântica-Cerrado e Pampa-Mata Atlântica (Figura 1).

Segundo a Lei Nº 11.428 de 26 de dezembro de 2006 em seu Art. 2 diz que:

Art. 2º Para os efeitos desta Lei, consideram-se integrantes do Bioma Mata Atlântica as seguintes formações florestais nativas e ecossistemas

associados, com as respectivas delimitações estabelecidas em mapa do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE, conforme regulamento: Floresta Ombrófila Densa; Floresta Ombrófila Mista, também denominada de Mata de Araucárias; Floresta Ombrófila Aberta; Floresta Estacional Semidecidual; e Floresta Estacional Decidual, bem como os manguezais, as vegetações de restingas, campos de altitude, brejos interioranos e encraves florestais do Nordeste. (BRASIL, 2006).

Figura1: Imagens contendo os limites (linha vermelha) da Mata Atlântica (áreas em verde-claro) com outros Biomas. A figura A representa os limites (Caatinga-Mata Atlântica), figura B (Cerrado-Mata Atlântica) e figura C (Pampa-Mata Atlântica).



Fonte: IBGE (2019).

### 3.1.2 Restinga

A restinga é um ecossistema costeiro marinho pertencente ao Bioma Mata atlântica, formada a partir de depósitos arenosos que foram abrigados no decorrer do período quaternário. Durante esse período houve a regressão marinha, com consequente emersão da costa brasileira, o que resultou no seu surgimento (BARCELOS *et al.*, 2012; REIS, 2006). Segundo o Conselho Nacional do Meio Ambiente (CONAMA) em sua resolução de nº 261/1999, a restinga é formada por um conjunto de ecossistemas com vegetações distintas nos aspectos florísticos e fisionômicos, porém têm em comum a sua localização, que se dá em terrenos com predominância arenosa, sedimento esse de origem marinha, lagunar, além de fluvial, eólica ou por meio da combinação desses (BRASIL, 1999).

A formação do solo tem origens diversas, podendo ocorrer através da translocação de partículas de poeiras pelo ar, carregamento de areia pela água e também sob a ação das intemperes nas rochas, que por sua vez se degradam e acumulam matéria orgânica, e esses elementos influenciam à vasta riqueza de espécies vegetais presentes nesse ecossistema (BARCELOS, *et al.*, 2012). A restinga exhibe particularidades de caráter florístico e pedológico tornando-se diferente dos manguezais e costões rochosos, além características fitofisionômicas variadas cuja formação está associada a fatores edáficos, pedológicos e inundação do solo (MAGNAGO *et al.*, 2010).

A geomorfologia, topografia, além de forte influência marítima e flutuação dos níveis dos lenções freáticos, são variáveis que também afetam a diversidade de formações vegetais. Devido a variação topográfica de relevo, existem áreas em que há o afloramento dos lençóis freáticos, influenciando nas inundações do solo, e outras áreas onde os solos não são inundados, pois há uma predominância em formações de cordões arenosos mais elevados, fazendo com que as águas afloradas não os alcancem (MONTEIRO *et al.*, 2014).

As comunidades vegetais são consideradas edáficas, visto que sua diversidade sofre mais influência do solo invés de outros fatores como o clima, por exemplo (SOUZA *et al.*, 2008). Essas formações vegetais incluem: Formação halófila, formação aberta arbustiva de Palmae, formação arbustiva fechada de pós-praia, mata seca de restinga, brejo litorâneo, formação arbustiva de moita, formação de mata paludosa, campos de dunas, floresta periodicamente inundada e formação de

Ericacea (FERREIRA, 2013).

Esse ecossistema sofre por ações antrópicas devido a sua localização que é de grande interesse para ocupação, cujo intuito é proporcionar lazer e turismo. Outra vertente associada à sua degradação é a exploração com finalidades extrativistas (SACRAMENTO; ZICKEL; ALMEIDA JÚNIOR, 2007) processo desordenado de urbanização e exploração de espécies vegetais para ornamentação (LUIJK; SOLDATI; FONSECA-KRUEL, 2021). Apesar de toda essa pressão que direciona à ruptura de formações florísticas, a restinga apresenta uma alta riqueza e relevância do ponto de vista ecológico (MEDEIROS *et al.*, 2010) e também no que diz respeito à etnofarmacologia (PEREIRA *et al.*, 2020). Um estudo etnobotânico feito por Fonseca-Kruel *et al.* (2006) mostrou espécies localizadas em área de restinga que são usadas de forma medicinal, dentre essas espécies estão: Arueira, cajú, gravatá, ingá-mirim, pitanga e guriri, uma espécie de palmeira pertencente a família *Arecacea*. Outro estudo etnobotânico vem mostrando diversas utilidades de espécies palmeiras em área de restinga, onde a população faz uso desses vegetais para se alimentar, há também uso na ornamentação, uso místico-religioso e até com finalidades medicinais (OLIVEIRA; SANTOS; GOMES, 2018).

O Comitê Estadual de Reserva da Biosfera da Mata Atlântica CE-RBMA-AL, que fica localizado no estado de Alagoas, tem como objetivo a preservação dos ecossistemas florestais e principalmente os que pertencem a Mata Atlântica, e funcionam como articulador entre órgãos governamentais, não-governamentais, comunidade científica, moradores locais e também empresários. A Usina Coruripe, trabalha com a produção de açúcar, etanol e energia, possui filiais pelo Brasil dentre elas a do estado de Alagoas, que comporta uma RPPN - Reserva Particular do Patrimônio Natural da Mata Atlântica- (RPPN) e é um posto avançado da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica (RBMA), cujos pilares para a elegerem como um posto avançado, sugerem que os mesmos obedeçam a critérios, como: possuir funções que direcionem à proteção da biodiversidade, desenvolvimento sustentável e o conhecimento científico. Na Usina Coruripe são desenvolvidos trabalhos de preservação do pau-brasil, pesquisas científicas e também desenvolvimento sustentável através do uso da palha do ouricuri (*Syagrus coronata*) e licuri (*S. schizophilla*), espécies pertencentes a família *Arecacea* (MENEZES; CAVALCANTE; AUTO, 2004).

### 3.1.3 Família *Arecaceae*

Dentre a diversidade vegetacional abrigada pelas restingas encontram-se as espécies de palmeiras (REIS, 2006). A família das palmeiras -*Arecacea* - corresponde a um conjunto de aproximadamente 2.600 espécies com 181 gêneros distribuídos no planeta, tendo as regiões tropicais como pontos principais de ocorrência (BAKER; DRANSFIELD, 2016). A América de Sul é o continente no qual predomina a maior riqueza de espécies de palmeiras no mundo (PINTAUD *et al.*, 2008). No período terciário essa família obteve o auge de ocupação, se disseminando entre todos os continentes, porém durante o processo de dispersão a região equatorial se mostrou mais propícia a sua adaptação e diversificação das espécies. No Brasil a quantidade de espécies perfaz um total de 270 indivíduos distribuídos em 38 gêneros (SOARES *et al.*, 2014). O Nordeste brasileiro é contemplado com 83 espécies de *Arecaceae* (NOBLICK, 2019). Os indivíduos que compõem essa família são muito diferentes dos outros por apresentarem um porte elevado e elegante, sendo denominados “príncipes das florestas” pelos especialistas em plantas (MENDES *et al.*, 2019).

À inclusão das palmeiras em *Arecaceae* requer a existência de algumas particularidades relacionadas aos estipes, folhas, flores, frutos, características da anatomia dos órgãos, comparações cito-histológicas. Além disso, ainda são englobados parâmetros relacionados a história evolutiva da família e seus gêneros. (SOARES *et al.*, 2014). As palmeiras possuem estruturas morfológicas que as colocam no grupo das monocotiledôneas, e o que as difere do grupo das dicotiledôneas -dentre outras características- é a presença de um desenvolvimento típico de arquitetura monopodial tendo uma única gema terminal (DE CARVALHO MARIA; BIONDI, 2019). Podem apresentar os dois sexos sendo então consideradas monoicas, ou apresentar órgãos reprodutivos separados, correspondendo a espécies dioicas com representantes machos e fêmeas, e em relação a suas raízes elas podem ser aéreas ou subterrâneas (CAXAMBÚ *et al.*, 2015).

A exploração de recursos das espécies de palmeiras bem como o aproveitamento de seus fitoconstituintes, é uma prática que remonta épocas antigas (SOARES *et al.*, 2020). Há registros de seu uso por civilizações de muitas regiões do planeta, que disfrutavam das propriedades desse grupo vegetal para diversas finalidades, seja na ornamentação, nutrição ou até mesmo construção civil (SODRÉ, 2005). Um estudo feito por Soares *et al.* (2020) mostrou muitas formas de uso das

palmeiras sendo esses: cobertura de casas, produção de artesanatos, produção de alimento, ração para animais, uso da polpa *in natura*, extração do óleo de suas amêndoas. E isso se deve a diversidade na exploração, ressaltando dessa forma, a importância da família *Arecaceae*.

*Syagrus* é um grupo dentro das palmeiras que se encontra fortemente distribuído no Brasil (LIMA *et al.*, 2003; OLIVEIRA *et al.*, 2014; MEIRELES *et al.*, 2020; GUARDIA *et al.*, 2021; SANTOS; VITÓRIA, 2017) e tem a maior representatividade de espécies de palmeiras na região nordeste (GUIMARÃES *et al.*, 2021). Originalmente esse grupo taxonômico foi descrito por Martius em 1824, é caracterizado como um gênero morfológicamente muito variado e de ocorrência quase exclusiva do Brasil, existindo representantes de 53 espécies das quais 47 tem registros no território brasileiro (SOARES *et al.*, 2013). Há registro na literatura do uso de espécies de *Syagrus* para alimentação (CREPALDI *et al.*, 2001), paisagismo (SANTELLI; CALBO, M; CALBO, A. *et al.*, 2006), além de atividades medicinais como efeitos antimicrobiano, anti-inflamatório e antioxidante (FARIAS *et al.*, 2021). Dentre a diversidade de espécies do gênero *Syagrus*, encontra-se a *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman.

#### 3.1.4 *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman

*S. schizophylla* (Figura 2) pertence a família *Arecaceae*, é uma espécie de palmeira endêmica do Brasil de ocorrência na região nordeste, principalmente em vegetação de restinga, nos estados de Alagoas, Pernambuco, além de Sergipe e Bahia. É amplamente distribuída e conhecida popularmente como: aricuriroba, licuriroba, coco-babão, (BELTRAME; JASMIM; VIEIRA, 2019). Sua estrutura morfológica comporta uma altura que varia entre 1-4 m x 10-15 cm, possui uma coroa densa, em suas folhas especificamente nos pecíolos apresentam dentes ou espinhos. Seus frutos são produzidos em grandes quantidades, possui cerca de 3 cm e coloração amarelo-avermelhado a alaranjado, o endosperma produz amêndoas de sabor amargo (NOBLICK, 2019). A sua floração se dá por meio de inflorescência, que possui de 14-38 raquillas, as flores são pistiladas com 5-8 x 3-6 mm e raque curvada, possuindo 18-50 pinas de cada lado (SOARES *et al.*, 2013). Em relação à germinação das sementes de *S. schizophylla*, não há uma dormência fisiológica que se relacione ao embrião da planta, significando que o mesmo se desenvolve à medida que o fruto

amadurece (PIVETTA *et al.*, 2005).

Apresenta utilidades como ornamentação em jardins e cultivos em vasos (LORENZI *et al.*, 1996). As amêndoas produzidas por essa planta têm um alto valor calórico, podendo ser introduzida na alimentação da população, fato esse mostrado através da análise centesimal do óleo das amêndoas onde o mesmo apresentou cerca de 70% de lipídeo (PADILHA *et al.*, 2017). Um estudo mostrou que a *S. schizophylla* tem uso etnofarmacológico de sua raiz e casca para a produção de chá (LIMA FILHO; MARINHO, 2014).

Figura 2: Imagem demonstrando espécies de *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman



Fonte: O autor

O óleo produzido pelas amêndoas das palmeiras tem diversas funcionalidades, desde culinárias, como o óleo de *Syagrus coronata*, por apresentar um potencial alimentício e nutricional em sua composição (GUIMARÃES; SHIOSAKI; MENDES, 2021), cosméticos, como visto nas sementes de *Euterpe oleracea*, que também possui compostos de utilização para fins terapêuticos (LIRA *et al.*, 2021). Há na literatura ensaios sobre o efeito da toxicidade do óleo das amêndoas de *Syagrus coronata*, espécie do mesmo gênero que a palmeira em estudo, onde o mesmo não mostrou toxicidade ao organismo de camundongos (SOUZA *et al.*, 2021), porém a literatura não traz estudos com óleo da *S. schizophylla* sobre os efeitos tóxicos ao organismo.

Entender o perfil toxicológico é muito importante para dar sustentação a estudos futuros que visem utilizar a espécie de forma segura.

### 3.5 Aspectos Toxicológicos dos Produtos Naturais

O uso de plantas para cura de enfermidades é uma prática milenar na história da humanidade. Através de relatos em diversos escritos antigos: chineses, egípcios, romanos, gregos e indianos foi constatado que a fitoterapia é praticada há cerca de 5000 anos (FARZAEI *et al.*, 2020). No entanto, há uma ideia difundida de que os fitoterápicos são totalmente seguros e assim muitas pessoas são induzidas a fazer uso dos mesmos de forma desordenada, o que pode ser prejudicial ao organismo, tornando o indivíduo suscetível a danos em órgãos como o fígado, por exemplo (PARVEZ; RISHI, 2019).

A fitoterapia é um ramo da ciência direcionado ao uso de produtos naturais como alternativa ou complemento à medicamentos alopáticos, porém as administrações indiscriminadas desses agentes terapêuticos podem gerar intoxicação ou ineficiência do princípio ativo (BRUNING; MOSEGUI; DE MELO VIANNA *et al.*, 2012). Vale reforçar o cuidado no uso de plantas para fins medicinais, pois embora advenham de origem natural, o que muitas vezes justifica seu uso inadequado, podem apresentar efeitos nocivos ao organismo (FARZAEI *et al.*, 2020).

Um estudo mostrou que no Brasil a incidência de intoxicação por plantas durante os anos de 2012 a 2016 obteve maior taxa para pessoas que fazem uso de plantas de forma individual sem a orientação de um profissional ou nem sequer buscam por fontes confiáveis para fazer o uso das mesmas (TEIXEIRA *et al.*, 2020). Mais de 100.000 pacientes são recebidos nos centros de intoxicação por apresentarem sinais de toxicidade por plantas medicinais, sejam esses, casos mais leves nos quais crianças ingerem baixa quantidade, ou ainda casos mais graves de intoxicação por engano (FARZAEI *et al.*, 2020).

Devido à falta de padronização e controle das propriedades farmacológicas e tóxicas, há uma resistência na prescrição para o uso de fitoterápicos, sendo assim, a inserção dos mesmos na terapêutica médica será mais efetiva se obedecerem aos critérios de segurança, eficácia e qualidade, requisitos esses que também são preconizados para medicamentos de uso convencional (RATES, 2001; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010). Enfatiza-se, assim, a importância do estudo do perfil

toxicológico de plantas com potencial fitoterápico a fim de obter parâmetros de segurança quanto ao seu uso.

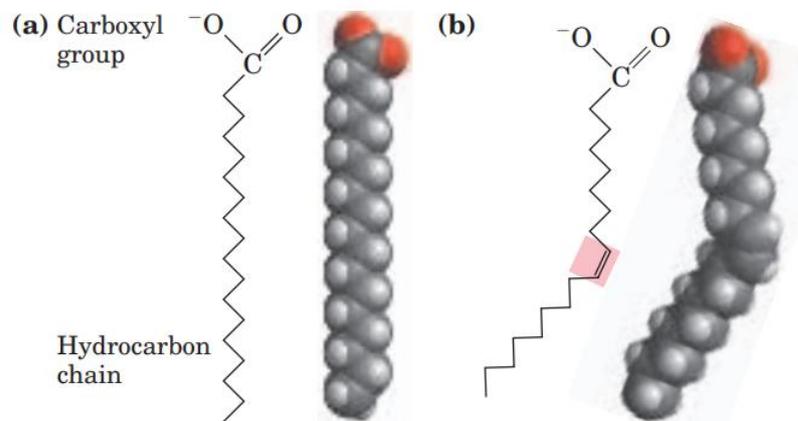
As moléculas majoritárias encontradas no óleo das amêndoas de diversas espécies do gênero *Syagrus* são os ácidos graxos, que embora apresentem múltiplas funções no organismo, inclusive a de fornecer energia para o seu funcionamento (DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018), dependendo do tipo e da dosagem ingerida, podem apresentar aspectos tóxicos (LISTENBERGER *et al.*, 2003).

### 3.6 Ácidos Graxos (AG)

Os lipídeos são popularmente chamados de gorduras e estão presentes em diferentes partes do organismo, desempenhando diversas funções (NASCIUTTI *et al.*, 2015). É um grupo de compostos heterogêneo cujas características em comum se relacionam, em sua maioria, pelas propriedades físicas e não químicas. Dentre as classes dos lipídeos estão presentes os AG, triacilgliceróis, ceras, fosfolipídeos, esfingolipídeos (ARAÚJO *et al.*, 2017).

Ácidos graxos são lipídeos classificados como metabólitos primários que têm funções estruturais, plásticas, além de ser uma fonte energética (VIZZOTTO; KROLOW; WEBER *et al.*, 2010). Estão presentes em todos os organismos vivos, sendo que no reino vegetal existem cerca de 450 tipos (SANTOS; SANTOS LIMA; CASTRO, 2021). Em óleos e também gorduras de origem natural é comum que os mesmos estejam presentes sob sua forma esterificada, na qual é denominada de ácido graxo livre (ARAÚJO *et al.*, 2017). A biossíntese dos AG se dá por processos interativos e envolve uma maquinaria que possui um alto grau de complexidade (BELD; LEE; BURKART, 2015). Nas plantas eles exercem diversas funções, sejam elas, estruturais, energéticas e até mesmo na defesa do organismo (LIM *et al.*, 2017; DE CARVALHO; CARAMUJO, 2018). Estruturalmente os AG são compostos por uma cadeia hidrocarbonada ligada em uma de suas extremidades a um grupo carboxila -COOH- (Figura 3) (DE SOUZA; MATSUSHITA; VISENTAINER, 1998).

Figura 3: Estrutura molecular de um ácido graxo. Em (a) representando um AG saturado e em (b) um AG insaturado no qual a saturação se evidencia pela dupla ligação marcada em rosa, na cadeia hidrocarbonada.



Fonte: NELSON; COX, 2005

Dependendo do tipo de ligação química presente nas cadeias dos AG eles se classificam em dois tipos: Ácidos graxos saturados e insaturados, sendo os saturados aqueles que não apresentam dupla ligação entre carbonos e os insaturados aqueles que possuem um ou mais carbonos com dupla ligação (Figura 2) (NASCIUTTI *et al.*, 2015; MOREIRA *et al.*, 2002; TVRZICKA *et al.*, 2011).

Os AG ainda podem ser classificados de acordo com a quantidade de carbono que os compõem, em: AG de cadeia curta, são os que possuem em sua composição um número de carbonos variando entre (1-6), os de cadeia média (7-12) e os de cadeia longa a partir de 13 átomos de carbono (SCHÖNFELD; WOJTCZAK, 2016; DEEN *et al.*, 2021). Nos seres vivos sua composição varia entre as espécies e nos tecidos, tanto em relação ao tipo quanto a proporção dos mesmos (TVRZICKA *et al.*, 2011).

As plantas superiores os mais comuns são: Ácido láurico, mirístico, palmítico, esteárico, sendo esses os saturados e os ácidos: oleico, linoleico e linolênico os insaturados (SANTOS; SANTOS LIMA; CASTRO, 2021). Estudos vêm mostrando que na composição dos óleos das amêndoas de espécies do gênero *Syagrus* dentre os AG mais presentes estão: ácido láurico, mirístico e palmítico sendo que o ácido láurico apresenta-se como o componente majoritário (SOUZA *et al.*, 2021; MEIRELES, 2017; COIMBRA, 2010; LAURELES *et al.*, 2002).

### 3.6.1 Metabolismo dos Ácidos Graxos

Os AG podem ser obtidos através da dieta por diversas fontes alimentares, sejam elas vegetais, animais ou também de organismos marinhos (MOREIRA *et al.*, 2002). Cerca de 95% dos lipídios ingeridos na dieta estão em forma de triglicerídeos e os outros 5% estão presentes na forma de AG livre, colesterol, fosfolipídeos (SANTOS *et al.*, 2006). O processo de digestão lipídica se inicia com a sua hidrólise na cavidade oral e no estômago, posteriormente são encaminhados para o duodeno onde sofrem o processo de emulsificação que é efetivado com o auxílio dos sais biliares formando as micelas (MOREIRA *et al.*, 2002). As micelas são compostas por ésteres de colesterol, além de triacilgliceróis e fosfolipídeos, onde os mesmos são digeridos pela lipase e colipase para serem inseridos no interior dos enterócitos (MOREIRA *et al.*, 2002), sendo capazes de absorver com eficiência cerca de 95% dos lipídios dietéticos (UCHIDA *et al.*, 2013).

Dependendo do tipo de AG consumido na dieta, os enterócitos podem esterificá-los a triglicerídeos, empacotá-los em quilomícrons e direcioná-los aos vasos linfáticos, sendo esse o caso de AG de cadeia longa, ou encaminhá-los diretamente para o fígado em forma de AG livres através da corrente sanguínea alcançando a veia porta, onde lá se ligam de forma parcial à albumina plasmática e chegam ao fígado para serem rapidamente metabolizados, sendo esse tipo de transporte para os AG de cadeia curta e média (SCHÖNFELD; LECH WOJTCZAK, 2016). Os AG de cadeia média são rapidamente absorvidos pelo trato gastrointestinal (ROOPASHREE *et al.*, 2022).

No interior celular essas moléculas podem exercer diversas funções, como fazer parte da membrana celular, serem armazenados, podem ser usados como molécula para sinalização de lipídeos ou ainda serem oxidados para produção de energia (CURRIE *et al.*, 2013). O mecanismo pelo qual os AG são oxidados se chama  $\beta$ -oxidação (beta oxidação) que ocorre em maior parte pela mitocôndria, embora existam vias alternativas (RAO; REDDY, 2001). A  $\beta$ -oxidação consiste na conversão dos ácidos graxos em acetil Co-A e logo após essa oxidação há outro processo de oxidação das Co-As que resulta em  $\text{CO}_2$  e  $\text{H}_2\text{O}$  (MIURA, 2013).

O fígado tem um papel muito importante no que diz respeito a homeostase lipídica, realizando a síntese de triacilgliceróis com AG livres para a formação de gotículas lipídicas ou mobiliza a realização da oxidação desses AG através dos

peroxissomas e mitocôndrias à ATPs ou corpos cetônicos em condições de escassez de carboidratos (NAGARAJAN *et al.*, 2019). Estudos vêm mostrando que os AG podem ser benéficos ao organismo, porém dependendo do tipo bem como a quantidade dos mesmos ingeridas, podem apresentar efeitos danosos, sendo então tóxicos (MIYAGAWA *et al.*, 2018; YANG *et al.*, 2020).

### 3.7 Ensaios Não Clínicos

Órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e a Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) preconizam ensaios não clínicos para a implementação de novos medicamentos visando a segurança no que diz respeito à aspectos toxicológicos (ANVISA, 2013; OCDE, 2016). Ensaios não clínicos como: toxicidade de dose única, toxicidade por doses repetidas, toxicidade reprodutiva, tolerância local, estudo de carcinogenicidade, genotoxicidade, são alguns dos procedimentos preconizados pela ANVISA como parâmetros para determinar a toxicidade de uma substância. Para essa pesquisa os estudos toxicológicos adotados estão de acordo com as recomendações da ANVISA e OCDE para ensaios não clínicos. As metodologias foram: citotoxicidade, toxicidade de dose única (oral) e genotoxicidade.

#### 3.7.1 Citotoxicidade

Ensaios de citotoxicidade são metodologias *in vitro* muito utilizadas quando se quer saber o comportamento celular frente a ação de uma droga, com a finalidade de detectar o potencial citotóxico da mesma ou para aferir a proliferação celular após o seu uso (ANVISA, 2009). Estes testes são também comumente utilizados para auxiliar na elucidação do perfil toxicológico de compostos vegetais candidatos ao uso para fins terapêuticos (ROSA *et al.*, 2022; HACKE *et al.*, 2022; MCOTSHANA *et al.*, 2022; BEEBY *et al.*, 2020; NAGHIBI *et al.*, 2014; OCHWANG'I *et al.*, 2018). Avaliar a toxicidade *in vitro* é muito importante para determinar se um composto afeta e o quanto ele afeta os grupos celulares, sendo esse um preditivo para dar prosseguimento aos ensaios *in vivo* (SOUZA *et al.*, 2021; NESSLANY, 2017). Nesse estudo escolheu-se duas linhagens celulares: Adenocarcinoma Humano da Glândula Mamária (MDA-MB-231) e Macrófagos (J744-A1), por se tratar de grupos celulares que vêm sendo

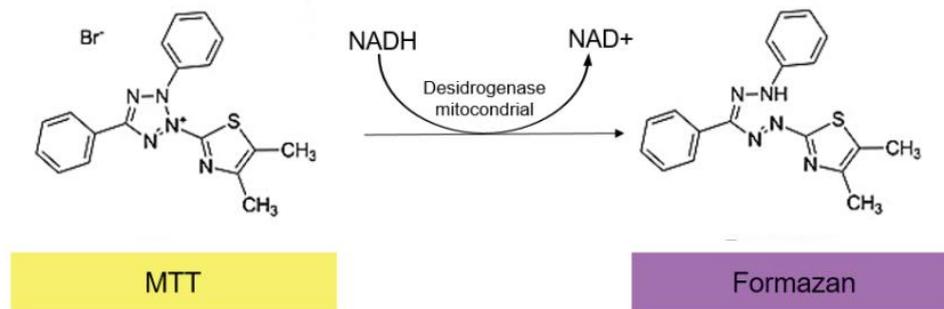
utilizados em pesquisas sobre citotoxicidade de diferentes compostos de origem natural (LAHMADI *et al.*, 2021; MOGHTADERI *et al.*, 2018; ZHAO *et al.*, 2014; ALJARI *et al.*, 2021; KHALIQ *et al.*, 2022; MAHMOUDVAND *et al.*, 2022; NAZER *et al.*, 2021; SOUZA *et al.*, 2021).

A linhagem celular de Adenocarcinoma Humano da Glândula Mamária (MDA-MB-231) foi obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Dentre outras propriedades, esse grupo celular é utilizado na avaliação da ação anticancerígena (FANG *et al.*, 2021; ASL *et al.*, 2021) auxiliando também na interpretação de testes de genotoxicidade (ABO-ZEID; ABO-ELFADL; GAMAL-ELDEEN, 2019). A linhagem celular MDA-MB-231 é um tipo de célula cancerígena muito agressivo e tem associação com o desenvolvimento de resistência ao tratamento (EL-ASHIMAWY *et al.*, 2020).

Já a linhagem de Macrófagos (J774-A1) também foi obtida do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Além de exercerem funções na homeostase, os macrófagos atuam no desenvolvimento, auxiliam no reparo tecidual e também em processos imunológicos, servindo de barreira contra patógenos que entram no organismo (WYNN; CHAWLA; POLLARD, 2013). Essas células são sensíveis a mudanças de caráter fisiológicos ocasionadas por estímulos ambientais a fim de manter a homeostase e, por sua vez, os AG livres atuam na modulação macrofágica influenciando na sobrevivência dos mesmos (KIM *et al.*, 2017). Sendo assim a análise da toxicidade com o uso dessas células pode fornecer informações importantes quanto a ação de compostos em responsáveis pela barreira imunológica.

Para a análise da citotoxicidade com essas linhagens celulares foi escolhido o ensaio de viabilidade celular com o uso do MTT (brometo de [3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil tetrazolium]). O MTT possui uma coloração amarela e se baseia no princípio da redução do sal de tetrazólio (solúvel em água) à formazano (insolúvel em água) mediada por ação enzimática, de modo que essa mudança resulta em alteração da coloração do composto e o que antes possuía um espectro amarelado ao ser metabolizado adquire uma coloração roxa (Figura 2.) (BENOV, 2021).

Figura 4: Imagem evidenciando o processo de redução do MTT à cristais de formazan



Fonte: MAGALHÃES, 2018

A viabilidade celular pode ser calculada através da averiguação da absorbância da coloração roxa por um espectrofotômetro, sendo essa absorbância comparada com um grupo controle (MOURA *et al.*, 2020). A diminuição da viabilidade frente ao uso do MTT pode decorrer de diversos fatores, que incluem: metabolismo, comprometimento da proliferação celular e até mesmo a morte celular (BELTZIG *et al.*, 2021).

Ensaio *in vitro* têm algumas vantagens em relação aos *in vivo*, como por exemplo: obtenção de dados de forma mais facilitada (ROGERO *et al.*, 2003), economia de espaço, uma vez que para os ensaios *in vivo* necessita-se de uma estrutura de biotério (CERQUEIRA, 2008). Para muitos estudos esse tipo de ensaio é recomendado como modelo a fim de evitar o uso de animais, como os testes que avaliam danos dermatológicos por exemplo (OCDE, 2016).

### 3.7.2 Genotoxicidade e Mutagenicidade

O DNA (Ácido Desoxirribonucleico) é uma molécula formada por uma dupla hélice, conhecida como a molécula da vida, isso porque ele comporta toda a informação genética que é passada para as novas células no processo de divisão celular (ALBERTS, 2003). Essas fitas contêm os genes, que pela classificação molecular se refere a sequências de nucleotídeos carregadoras da informação para a síntese proteica ou de RNA. E embora esse conceito ainda apresente suas controvérsias devido a complexidade e funções dos genes, ele é o mais utilizado (JOAQUIM; EL-HANI, 2010).

Os ácidos nucleicos estão expostos constantemente à ação agentes internos ou

externos e isso os torna passíveis de sofrerem danos em sua composição genética (JIANG; PANDA; GEKARA, 2019; AZQUETA *et al.*, 2019). Dano genético se refere a modificações na estrutura normal do material genético (SILVA JÚNIOR *et al.*, 2021). O desenvolvimento de sistemas de reparo de DNA ao longo a evolução foi uma forma que os organismos encontraram para evitar a progressão desses danos (LI & SANCAR, 2020; JIANG; PANDA; GEKARA, 2019). Porém dependendo da ação do agente à célula, as modificações genéticas podem ser repassadas sem que haja o devido reparo, ocasionando danos irreversíveis conhecidos como mutação. A ação de genotoxinas acontece por vezes de forma lenta e gradativa, significando que as manifestações genéticas decorrentes do seu uso surgem tardiamente (OCDE, 2016), e isso dificulta o diagnóstico precoce para uma intervenção mais rápida. Logo, é importante identificar precocemente a ação de compostos candidatos a fármacos sobre o material genético.

Os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade auxiliam na elucidação dos efeitos toxínogênicos provocados por medicamentos, agrotóxicos, cosméticos e até mesmo por compostos de origem natural (TURKEZ; ARSLAN; OZDEMIR, 2017). Esses dois termos possuem interpretações diferentes, sendo que a genotoxicidade é um termo mais abrangente que se refere à danos no material genético que podem ou não provocar mutação. Já a mutagenicidade é um subconjunto da genotoxicidade e expressa o resultado de danos que culminam em mutação genética (OCDE, 2016). A associação do Teste micronúcleo (TMN) e ensaio cometa (EC) é considerada um padrão na aferição do potencial genotóxico e mutagênico uma vez que apresentam diversas vantagens como alta sensibilidade, baixo custo, robustez, além de alto poder estatístico (ARALDI *et al.*, 2015). Ambas as metodologias se complementam, de modo que o EC detecta danos que podem ou não ser reparados pelos sistemas de reparo de DNA, e o TMN, que detecta modificações genéticas que não foram reparadas e consequentemente foram passadas para outras células durante o processo de divisão celular (JIANG; PANDA; GEKARA, 2019; HEUSER *et al.*, 2008).

### 3.7.3 Ensaio Cometa

Os danos mais deletérios se expressam quando há a quebra da dupla fita de DNA o que pode resultar em câncer, por exemplo (JIANG; PANDA; GEKARA, 2019). E uma forma de evidenciar esse dano é através do Ensaio cometa (EC) cujo princípio

se baseia na detecção de afecções ao material genético através da migração de fragmentos genômicos por eletroforese em gel de agarose. Primeiro, as lâminas, com a amostra do material a ser analisado, são cobertas por uma fina camada de gel de agarose, posteriormente as células ali presentes são lisadas com o uso de um detergente e então submetidas à técnica de eletroforese, onde os fragmentos da molécula de DNA migra para a região do ânodo e assim forma a trilha eletroforética cauda), que pode ser visualizada através da microscopia de fluorescência por meio de uma coloração especial (AFANASIEVA & SIVOLOB, 2018). Esses danos ao serem analisados no microscópio aparecem distribuídos formando uma espécie de calda que simula um cometa, característica essa que atribuiu o nome à técnica. (GAJSKI; LANGIE; ZHANATAEV, 2020). O EC é uma das técnicas mais utilizadas para detecção de danos ao DNA e pode ser realizado em diferentes grupos celulares (MAY *et al.*, 2022) e tecidos (GAJSKI; LANGIE; ZHANATAEV, 2020). Existem dois métodos de avaliar o dano genético por EC: o EC neutro e o alcalino. O EC neutro detecta quebra de fita dupla, e a versão do EC alcalina é capaz de detectar tanto quebra de fita simples como dupla, embora que haja evidências que o EC neutro também possa detectar a quebra de fita dupla (AFANASIEVA & SIVOLOB, 2018). Devido ao poder de maior sensibilidade quanto à detecção de danos, o EC realizado nesse estudo foi pelo método alcalino.

#### 3.7.4 Teste Micronúcleo

Micronúcleos são fragmentos cromossômicos encontrados externamente ao núcleo e representam danos genéticos que podem ocorrer de forma natural como envelhecimento, processos metabólicos ou ainda podem ser provocados através de hábitos de vida, por exemplo (SOMMER; BURACZEWSKA; KRUSZEWSKI, 2020). Esses danos são passíveis de identificação através do teste micronúcleo (MOTTO *et al.*, 2021). O dano citogenético ocasionado se dá por meio de agentes clastogênicos que por sua vez interferem na divisão celular promovendo a quebra de cromossomos, ou por agentes aneugênicos, sendo esses relacionados a danos no fuso mitótico, incapacitando a migração do cromossomo (ARALDI *et al.*, 2015). Quando algum composto produz danos ao DNA, conseqüentemente pode-se aumentar a ocorrência de micronúcleos (D'AGOSTINI; ALZZOTTI; FLORA, 1993).

O TMN foi inicialmente descrito por Schmid e Jenssen Ramel, que utilizaram a

medula óssea em seus experimentos, porém estudos posteriores demonstraram que o uso de sangue periférico é tão eficiente quanto a utilização do sangue medular, sendo o método de coleta por sangue periférico simples de ser realizado, além de apresentar um dinamismo na coleta de sangue visto que há a possibilidade de diversas coletas no mesmo animal durante o período experimental. O sangue periférico dos grupos foi coletado 48Hrs após a indução dos compostos a fim de se avaliar aberrações cromossômicas em eritrócitos policromáticos (EPC), sendo essas 48Hrs o tempo que obtém melhor pico de dano.

### 3.7.5 Toxicidade Oral de Dose Única (Aguda)

Embora existam métodos *in vitro* para avaliar a citotoxicidade de alguma substância, os mesmos atuam como adjuvante à indicação prévia das doses iniciais no teste *in vivo*. Porém para avaliar os efeitos tóxicos nos sistemas fisiológicos são necessários ensaios de toxicidade (VALADARES, 2006). Existem algumas metodologias para determinar a toxicidade: toxicidade oral de dose única (aguda), toxicidade oral de doses repetidas (crônica) e toxicidade reprodutiva (ANVISA, 2013).

A toxicidade oral de dose única (aguda) é um teste preconizado tanto pela ANVISA quanto pela OCDE com objetivo de avaliar os efeitos que determinados compostos podem provocar no organismo nas primeiras 24 horas após sua administração (ANVISA, 2013; OCDE, 2016). Órgãos regulamentadores disponibilizam guias cujo objetivo é orientar os pesquisadores para a realização dos testes de toxicidade.

A OCDE disponibiliza guias para o ensaio de toxicidade oral de dose única, nos quais versam sobre procedimentos e técnicas cujo tipo de ensaio dependerá do objetivo da pesquisa bem como os conhecimentos prévios do composto a ser testado. Esses guias sofrem alterações periodicamente, a fim de melhorar a qualidade das pesquisas. Para ensaios com substâncias com possíveis potenciais farmacológicos, um dos pré-requisitos é conhecer os constituintes desta, verificar estudos anteriores sobre sua toxicologia *in vivo* ou *in vitro* e se não houver pesquisas anteriores, deve-se considerar estudos que foram realizadas com substâncias que possuem uma composição semelhante ao mesmo. Dependendo da composição ou dos relatos da literatura sobre o potencial toxicológico, pode-se adotar dois tipos de ensaios: o teste limite e o teste principal.

O teste limite e o teste principal são duas metodologias que devem ser usadas para diferentes casos, sendo que o teste limite parte do princípio de que o composto a ser testado tem sua composição química elucidada e a mesma apresentou uma baixa toxicidade quando foi submetida a outros ensaios ou possui características quimicamente conhecidas de substâncias já testadas que não apresentaram um perfil tóxico. Com base nisso, e considerando os ensaios de citotoxicidade realizados nessa pesquisa, embora não existam estudos que tragam a toxicologia do óleo das amêndoas de *S. schizophylla*, uma pesquisa recente feita por Santos Souza *et al.*, (2021) mostrou que a análise do perfil toxicológico do óleo fixo das amêndoas de *Syagrus coronata* -espécie da mesma família e gênero da *S. schizophylla*- não demonstrou alterações tóxicas relevantes no organismo dos animais quando os mesmos foram submetidos à toxicidade oral aguda. Como o óleo fixo das amêndoas de *S. schizophylla* apresenta uma caracterização de compostos semelhante ao da *S. coronata*, foi proposto o teste limite no qual se utiliza 2000 mg/Kg em dose única.

#### 3.7.5.1 Parâmetros Avaliados na Toxicidade Oral

Após a escolha das dosagens e aplicação das mesmas, os animais necessitam passar por avaliações que vão desde os primeiros minutos que se seguem imediatamente após a administração até à análise histológica dos tecidos (MOURA *et al.*, 2020). Dentre essas avaliações tem-se: Screening hipocrático; consumo de ração, água e peso corporal; análises bioquímicas do sangue e histopatologia de órgãos.

O screening hipocrático é a primeira avaliação que se faz, ele fornece um panorama de forma geral da natureza farmacológica de alguma substância na qual não se tem conhecimento, permitindo verificar o estado de consciência do animal, através de parâmetros relacionados ao sistema nervoso central, periférico e autônomo, como: tremores, lacrimação, piloereção, straub, convulsão, força para agarrar, morte, bem como outras atividades (MOURA *et al.*, 2020; LUCIO *et al.*, 2000).

O sangue é um tecido conjuntivo constituído de células e plasma, que exerce diversas funções no organismo e é responsável pelo transporte de O<sub>2</sub>, CO<sub>2</sub>, nutrientes, além de metabólitos das regiões nas quais esses compostos foram sintetizados para distribuição pelo corpo, e por fim o sangue também é responsável pela eliminação de restos metabólicos que são recolhidos, transportados aos órgãos de excreção e lá são

eliminados para o meio externo (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013).

O intestino delgado tem como principal função a digestão bem como absorção dos nutrientes presentes nos alimentos consumidos (UCHIDA *et al.*, 2013). Após esse processo os nutrientes são enviados pela corrente sanguínea e através da veia porta esse sangue chega ao fígado (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2013). O fígado faz parte do metabolismo de diversas substâncias, das quais quando ingeridas por via oral passam obrigatoriamente por esse órgão e, portanto, o mesmo é mais suscetível a lesões induzidas por drogas devido a essas características vasculares e também pelas suas particularidades metabólicas (ZANG *et al.*, 2020). Muitas dessas afecções podem ser averiguadas através de exames bioquímicos sanguíneos, já que os mesmos produzem proteínas/enzimas que ao serem analisadas, suas concentrações podem demonstrar se à nível fisiológico esses órgãos foram afetados. Como no estudo optou-se pela avaliação do fígado, rins e baço, devido a esse papel ativo no metabolismo de substâncias, os parâmetros bioquímicos sanguíneos foram avaliados de acordo com enzimas na qual suas alterações podem sugerir alguma toxicidade nesses órgãos.

#### 4 Análises Estatísticas: Escolhendo o Teste Mais Adequado

Para que um trabalho de pesquisa apresente resultados o mais fidedigno possível, faz-se necessária a obediência metodológica, que se fundamenta desde a escolha do modelo animal até às análises estatísticas (THIESE; ARNOLD; WALKER SD, 2015). A escolha do tipo de teste estatístico é crucial para expressar o que as variáveis analisadas dizem sobre os dados coletados, de modo que um erro pode culminar em interpretações equivocadas dos resultados (MISHRA *et al.*, 2019). A fim de escolher o teste estatístico adequado, nessa pesquisa considerou-se os dados que passaram primeiramente por um processo de identificação de outliers e posteriormente foram submetidos a testes de normalidade de dados.

Outlier é um termo relacionado a um ponto de dados dentro de um conjunto de valores que pode está ligado a erros nas atribuições desses valores ou pode ser fruto de um processo natural da população analisada (SALGADO *et al.*, 2016; EMBORG, 2023). Muitos pesquisadores suprimem os outliers por se tratar de dados que podem influenciar significativamente nos resultados, no entanto é importante analisar de forma minuciosa a necessidade ou não de se retirar os dados anormais, pois os mesmos podem ser válidos para o estudo (THIESE *et al.*, 2015).

Após a análise criteriosa dos outliers é comum que os dados passem por um teste de normalidade, com objetivo de adotar o teste estatístico mais adequado para a análise descritiva e inferencial (MIOT, 2017), usando-se uma estatística não paramétrica para dados que não seguem uma distribuição normal ou uma estatística paramétrica para os que têm um padrão de distribuição normal (CHOI, 2018). A distribuição normal, que pode ser representada graficamente através da curva de Gauss diz que os dados tendem a se acumular em torno de um ponto próximo ao centro, sendo essa característica denominada de tendência central e na distribuição não normal isso não acontece (HEGENBERG, 1998).

Existem diversos tipos de testes para se determinar a normalidade dos dados. Nessa pesquisa foi considerado os testes de normalidade seguindo o estudo de Miot (2017) onde ele correlaciona o tamanho das amostras com o tipo de teste de normalidade a ser utilizado. Testes como Kolmogorov-Smirnov, Shapiro-Wilk, Anderson-Darling e D'agostino-Person dentre outros, são normalmente usados para inferir se os dados obedecem a um padrão de distribuição normal. A escolha bem como a aplicação desses testes dependem da quantidade de amostras. Para amostras entre 4 e 30 unidades o teste de Shapiro-Wilk é o mais recomendado, pois usando esse teste há uma menor possibilidade de o conjunto de dados ser acometido pelo erro tipo I<sup>1</sup>. Já para amostras com n maior que 100 o melhor teste adotado é o D'agostino-Person, pois com esse teste os dados têm menor chance de serem afetados pelo erro tipo II<sup>2</sup>. Para dados maiores que 50 pode ser usado também o teste Anderson-Darling. O Kolmogorov-Smirnov têm algumas limitações e pode ser substituído pelos testes de normalidade de dados acima mencionados.

---

<sup>1</sup>Erro tipo I: Possibilidade de encontrar uma diferença significativa mesmo que as amostras analisadas não possuam diferença entre elas.

<sup>2</sup> Erro tipo II: Possibilidade de não encontrar diferença significativa, embora que as amostras analisadas possuam diferenças entre elas.

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados dessa dissertação estão apresentados na forma de artigo.

### **AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E TOXICIDADE ORAL AGUDA DO ÓLEO FIXO DAS AMÊNDOAS DE *Syagrus schizophylla* (Mart.) GLASSMAN**

Pedro Thiago da Silva<sup>1</sup>, Maria Nayara de Lima Silva<sup>1</sup>, Lucas Felipe de Melo Alcântara<sup>1</sup>, Talita Giselly dos Santos Souza<sup>2</sup>, Marlllyn Marques da Silva<sup>2</sup>, Noemia Pereira da Silva Santos<sup>2</sup>, Fábio Henrique Galdino dos Santos<sup>3</sup>, Daniela Maria do Amaral Ferraz Navarro<sup>3</sup>, Katharina Marques Diniz<sup>1</sup>, Wendeo Kennedy Costa<sup>1</sup>, Cristiano Aparecido Chagas<sup>2</sup>, Maria Tereza Dos Santos Correia<sup>1</sup> Francisco Carlos Amanajás de Aguiar Júnior<sup>2</sup>, Márcia Vanusa da Silva<sup>1</sup>

<sup>1</sup>*Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco*

<sup>2</sup>*Centro Acadêmico da Vitória, Universidade Federal de Pernambuco*

<sup>3</sup>*Departamento de Química Fundamental, Universidade Federal de Pernambuco*

#### **Resumo**

O objetivo da pesquisa foi investigar a toxicidade do óleo fixo das amêndoas de *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman. Para isso, foram realizados ensaios de citotoxicidade em linhagens celulares de Adenocarcinoma Humano da Glândula Mamária (MDB-MB-231) e linhagens de macrófagos (J744A.1), ensaios de genotoxicidade, através do ensaio cometa e teste micronúcleo. E por último a toxicidade oral aguda, com a administração de 2000 mg/kg V.O do óleo e posterior observação de características comportamentais, peso de órgãos, análise bioquímica sanguínea e histológica dos órgãos. No geral o óleo das amêndoas apresentou alta viabilidade às linhagens celulares, exceto para a concentração de 200 µg/mL na linhagem de macrófagos J774A.1, na qual causou citotoxicidade. Não se verificaram alterações genotóxicas nas frequências de eritrócitos policromáticos, bem como também não houve alteração nas frequências de danos e índices de dano em células sanguíneas nucleadas. Não houve alterações comportamentais dos animais, no

consumo de ração e na variação do peso. Os parâmetros bioquímicos do sangue não divergiram significativamente ao comparar o grupo teste com o controle e não foram vistas alterações nos pesos do fígado, rim e baço, bem como não foram observadas alterações histopatológicas nos órgãos. Essa pesquisa não garante a total segurança no uso do óleo, porém traz subsídios para pesquisas posteriores que visem a elucidação do perfil toxicológico do OAS.

**Palavras-Chave:** Toxicidade. Genotoxicidade. Produtos naturais. *Syagrus schizophylla*.

## Introdução

Uso de plantas medicinais direcionado ao tratamento de patologias, prevenção e cura é uma prática muito antiga da humanidade (JÚNIOR *et al.*, 2005; GOMEZ *et al.*, 2016). No Brasil há uma grande diversidade de riqueza vegetal, o que faz dele um país propício ao desenvolvimento de metodologias de cunho terapêutico com uso de fitoterápicos (DA ROCHA *et al.*, 2021). Porém há uma preocupação no que concerne ao uso inadequado desses produtos, carecendo assim de estudos que visem à administração dos mesmos de forma racional (SANTOS *et al.*, 2011).

*Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman pertence a família *Arecaceae*, é uma espécie de palmeira endêmica do Brasil, conhecida popularmente como: aricuriroba, licuriroba, coco-babão, e ocorre na região nordeste, principalmente na restinga, sendo essa uma vegetação de Mata Atlântica (BELTRAME; JASMIM; VIEIRA, 2019). Apresenta utilidades como: ornamentação em jardins e cultivos em vasos (LORENZI *et al.*, 1996). As amêndoas produzidas por essa palmeira têm um alto valor calórico, podendo ser introduzida na alimentação da população, fato esse mostrado através da análise centesimal do seu óleo, onde o mesmo apresentou cerca de 70% de lipídeo (PADILHA *et al.*, 2017). Um estudo mostrou que a *S. schizophylla* tem uso etnofarmacológico de sua raiz e casca para a produção de chá (LIMA FILHO; MARINHO, 2014). No entanto não há na literatura estudos que versem sobre os parâmetros tóxicos de seus fitoconstituintes.

Órgãos como a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) e Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) instituem além de outros procedimentos de segurança para o uso de compostos candidatos a fármacos, ensaios pré-clínicos, como uma forma de dar sustentação à futuras pesquisas de natureza clínica (ANVISA, 2013; OCDE, 2016). Os fitofármacos são agentes promissores para o uso na terapêutica de diversas enfermidades, porém o uso irracional dos mesmos, bem como a falta de informação sobre a composição e segurança toxicológica, podem inviabilizar sua utilização (CASTILHO *et al.*, 2021). Portanto é de fundamental importância o teste de segurança para o uso de plantas medicinais, visto que a tradicionalidade da sua administração não garante a segurança como fitoterápico (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

Devido à falta de padronização e controle das propriedades farmacológicas e tóxicas, há uma resistência na prescrição para o uso de fitoterápicos, sendo assim, a

inserção dos mesmos na terapêutica médica será mais efetiva se obedecerem aos critérios de segurança, eficácia e qualidade, requisitos esses que também são preconizados para medicamentos de uso convencional (RATES, 2021; SOUZA-MOREIRA *et al.*, 2010).

Embora o óleo das amêndoas da espécie *S. schizophylla* se apresente como um forte candidato ao consumo humano devido ao seu teor lipídico, o que fortalece a possibilidade do seu uso, não há na literatura estudos que mostrem os possíveis efeitos em relação a toxicidade. Devido a necessidade de se obter cada vez mais substâncias com potencial farmacológico e observando que os produtos de origem natural têm se destacado como ótimos fármacos, esse artigo se direciona a investigação de aspectos tóxicos do óleo fixo das amêndoas de *S. schizophylla* através da avaliação dos parâmetros relacionados à citotoxicidade, toxicidade oral aguda, genotoxicidade e mutagenicidade.

## **Materiais e métodos**

### Obtenção do Óleo Fixo da Amêndoas de *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glassman

As amêndoas foram coletadas na Usina Coruripe, localizada no estado de Alagoas, Brasil. A identificação do espécime bem como seu registro foi feito no Herbário do Departamento de Biologia da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE) com voucher sob nº 55.148 BR-AL-CORURIFE, B.O VERAS. Para a extração do óleo fixo utilizou-se a técnica de prensagem a frio.

### Determinação do Perfil de Ácidos Graxos

O perfil lipídico da amostra foi determinado utilizando cromatografia gasosa e espectrometria de massas, após conversão prévia dos ácidos graxos em seus respectivos ésteres metílicos. E a cromatografia foi usada para análise de ésteres metílicos de ácidos graxos, ambos utilizando metodologias descritas no trabalho de Lima, Navarro e Souza-Santos (2013) de modo que para as análises de ésteres metílicos, fez-se adaptações metodológicas.

## Esterificação dos ácidos graxos

A amostra lipídica inicialmente foi submetida a uma solvólise, seguida de esterificação para ésteres metílicos. Suspendeu-se uma amostra de 150 mg de óleo de *S. schizophylla* em 2 mL de clorofórmio, acrescentou-se 2 mL de solução de KOH/MeOH na concentração de 0,5 mol/L e realizou-se a reação em banho de óleo de silicone, sob agitação e refluxo, a 100 °C, durante 5 min. Em seguida, realizou-se a esterificação propriamente dita, segundo a metodologia ISO (2002). Adicionou-se 2 mL de BF<sub>3</sub>/MeOH (12%), mantendo-se a agitação e o refluxo e a reação prosseguiu por 30 min, também na temperatura de 100 °C.

Terminada a reação, esperou-se a amostra esfriar, acrescentou-se 0,5 mL de solução aquosa saturada de cloreto de sódio e realizou-se extração com 5 mL de heptano, sendo repetida quatro vezes. Em seguida, adicionou-se sulfato de sódio anidro para remoção de água residual, filtrou-se, e concentrou-se a amostra sob fluxo de nitrogênio até que fosse reduzida a uma gota. A mistura de ésteres metílicos foi então purificada utilizando cromatografia em coluna, com os eluentes heptano, mistura de heptano/diclorometano (1:1) e diclorometano, nos volumes respectivos de 25, 30 e 20 mL. A fase estacionária utilizada foi sílica gel 60 (70-230 mesh). As frações foram concentradas até 0,5 mL e analisadas via cromatografia gasosa e cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas.

## Análise cromatográfica dos ésteres metílicos de ácidos graxos

Inicialmente, fez-se a identificação dos ésteres metílicos de ácidos graxos por cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massas. Utilizou-se um equipamento do tipo quadrupolo Agilent, modelo 5977B, equipado com uma coluna capilar de sílica fundida HP-5ms não polar (Agilent J&W) (30 m × 0,25 mm i. d.; espessura do filme 0,25 mm). O gás de arraste utilizado foi o hélio, fornecido a uma taxa de fluxo de 1,4 mL/min. O injetor e o detector foram mantidos a 250 °C, e a temperatura do forno foi programada da seguinte maneira: iniciar em 60 °C, mantendo por 2 min e, em seguida, aumentar a temperatura para 260 °C a uma taxa de 3 °C/min, mantendo por 47,5 minutos. A amostra (1 µL) foi introduzida na coluna com o injetor com split 1:150. A aquisição através de varredura foi de 35 a 550 m/z com uma taxa de varredura de 0,7 varreduras/s. A identificação dos compostos foi feita pela injeção

do padrão de ésteres metílicos de ácidos graxos (F.A.M.E. Mix C4-C24), comparando os tempos de retenção dos ésteres identificados na amostra com os tempos de retenção dos respectivos ésteres no padrão além da comparação dos espectros de massa com aqueles identificados na amostra pelas bibliotecas do espectrômetro de massas (NIST).

Uma vez realizada a identificação dos ésteres metílicos, estes foram quantificados utilizando cromatografia gasosa com detector de ionização em chama. O equipamento utilizado nas análises foi o TRACE GC Ultra (Thermo Scientific), equipado com uma coluna DB-5 não-polar, nas mesmas condições da análise via GC-MS. A quantificação dos ésteres metílicos foi realizada em triplicata, obtendo-se um valor médio para os teores, com respectivos desvios padrões, a partir da área relativa dos picos nos cromatogramas obtidos. Como os ésteres presentes são produto da esterificação dos ácidos graxos da amostra, o perfil obtido dos ésteres foi relacionado aos de ácidos graxos presentes inicialmente.

#### Ensaio de Citotoxicidade

Para averiguar o efeito citotóxico do OAS foram utilizadas as linhagens celulares de Adenocarcinoma Humano da glândula mamária (MDA-MB-231) e macrófagos (J774.A1), ambas obtidas do Banco de Células do Rio de Janeiro (BCRJ). Para manter as células da linhagem MDA-MB-231 utilizou-se o meio de cultura L-15 de Leibovitz e F-12 na proporção de 50% de cada meio com L-glutamina 2 mM -sem bicarbonato de sódio- e soro bovino fetal a uma concentração final de 10% com ausência de CO<sub>2</sub>. Já a linhagem J774A.1 foi mantida em Gibco Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de SFB e 5% de CO<sub>2</sub>. Visando o ensaio de viabilidade celular, as células foram contabilizadas em câmara de Neubauer.

A viabilidade foi aferida utilizando-se o ensaio de 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl) -2,5-diphenyl tetrazolium bromide (MTT) (Mosmann, 1983). As células foram inseridas em placas de 96 poços com uma densidade de  $1 \times 10^4$  de células/mL e após 24h de incubação as mesmas foram expostas ao OAS diluído em DMSO à 10% com concentrações finais de: 200, 100, 50, 25 e 12,5 µg/mL durante 24h. O óleo foi diluído em DMSO a 10%, e depois para as diluições seriadas foram solubilizadas no meio de cultura. Passadas 24h de exposição, foi adicionado ao meio de cultura 20µL de

solução de MTT (4mg/mL), e as placas foram incubadas durante 2-3h. Após o período de incubação, o sobrenadante foi removido e 100µL de DMSO (Dimethylsulfoxide) foram adicionados. Para avaliar os efeitos citotóxicos do OAS a absorvância foi medida em Leitor de Microplaca (Biotek Elx808) no comprimento de 630nm. A citotoxicidade foi expressa em viabilidade celular: (Abs -absorvância- da população celular tratada X 100 / Abs da população celular não tratada).

#### Modelo Animal

Foram utilizados camundongos machos albinos Swiss (*Mus musculus*) provenientes do biotério do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) pesando entre 35±10g com aproximadamente 8 semanas de idade. Os animais foram conduzidos ao biotério do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco/UFPE onde foram mantidos em caixas plásticas feitas com material de polietileno em um ambiente aclimatado com temperatura variando entre 22 ± 2 °C, fotoperíodo de 12h claro/escuro, alimentados com ração e água à vontade. Todos os procedimentos que envolveram animais passaram pelo crivo do Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE) e obteve aprovação sob o protocolo de nº0039/2021.

#### Ensaio Genotóxico e Mutagênico

Os ensaios de gonotoxicidade e mutagenicidade foram feitos segundo as metodologias encontradas nos estudos de Santos Souza *et al* (2021) e de acordo com os guias 474 e 489 da OCDE (2016). Foram utilizados camundongos machos Swiss *Mus musculus* em número de 15. Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em 3 grupos (n=5): Grupo GCN – grupo controle negativo sendo esse administrado com 0,5 ml de água deionizada via oral; Grupo GCP- grupo controle positivo que recebeu 25 mg/kg de ciclofosfamida via intraperitoneal; Grupo GOSs - grupo tratado com óleo das amêndoas de *S. schizophylla* que recebeu 2000 mg/kg (dose única) via oral. Os animais foram tratados por meio de gavagem e observados por duas horas a fim de verificar possíveis alterações em seus comportamentos e após 6 horas da administração das substâncias 15 microlitros de sangue foi coletado da veia caudal com auxílio de uma seringa de 1 ml para realização do ensaio cometa. Passadas 42 hrs depois dessa coleta os animais foram pesados e anestesiados com superdose

anestésica de cetamina (300mg/Kg) e xilazina (30mg/Kg) intraperitoneal. Então foram coletados 5 microlitros de sangue por punção cardíaca com uma seringa de 1 ml para o ensaio micronúcleo, após a coleta os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical.

### Ensaio Cometa (EC)

Para a averiguação do dano ao material genético em células nucleadas do sangue dos camundongos adotou-se o ensaio cometa, o protocolo utilizado foi o descrito nos estudos de Santos Souza *et al* (2021). Na etapa inicial do experimento, homogeneizou-se 15 µL de sangue coletado da região caudal de cada animal com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão, com posterior depósito da mistura em lâminas previamente untadas com agarose padrão à 0,5%. Cobriu-se as lâminas com lamínulas e então o material foi deixado em um refrigerador à uma temperatura de 4° C por 10 minutos. Posteriormente, as lamínulas foram retiradas e as lâminas foram postas em uma solução de lise (cloreto de sódio 2,5 M [NaCl], ácido etilenodiaminotetracético 100 mM [EDTA], 10 mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 13) e permaneceram em repouso nessa solução por 48 h.

Após esse procedimento as lâminas foram submersas e deixadas 20 minutos em uma solução de tampão alcalino de eletroforese (1 M NaOH e 200 mM EDTA sal dissódico, pH 13) para então dar seguimento a eletroforese em uma câmara horizontal sob amperagem em torno de 300 mA e 32 V, essa exposição à carga elétrica durou 20 minutos. Após esse procedimento fez-se a neutralização das lâminas com duração de 15 minutos em uma solução de tampão trisHCL 0,4 M a PH 7,5 e fixação em etanol absoluto durante 5 minutos. Para que os nucleóides pudessem ser visualizados utilizou-se 30 µL de solução de brometo de etídio (0,0002% p/v) como corante. A luz vermelha foi usada nos procedimentos que manipularam amostra sanguínea. Para as análises foi utilizado um microscópio de fluorescência de marca Zeiss-imager M2 sob ampliação objetiva de 40 x e filtro AlexaFluor 546 nm.

A fim de quantificar os danos ao material genético avaliou-se 100 nucleóides de cada animal totalizando 500 nucleóides por grupo experimental. A classificação dos danos ao DNA se deu através da leitura das lâminas no microscópio (Collins *et al.*, 2008), onde seguiu-se a proporção de material genético na cauda e cabeça do cometa sendo: 0 (sem dano), 1 (pouco dano aparente), 2 (dano médio), 3 (dano médio

alto) e 4 (dano alto). Para a análise dos 100 nucleóides, cada animal foi avaliado acerca de dois parâmetros: o índice de dano (DI) e a frequência de dano (DF). Os valores ID variam de 0 (sem dano) a 400 (dano máximo), enquanto os valores FD variaram de 0 a 100 para cada animal testado (COLLINS *et al.*, 2008; ROCHA *et al.*, 2019).

#### Teste Micronúcleo (TMN)

As amostras sanguíneas de cada animal foram coletadas e postas em 3 lâminas (por animal) sendo 5 µL por lâmina, previamente untadas com laranja de acridina, em seguida foram revestidas com lamínulas (SANTOS SOUZA *et al.*, 2021). Logo após esse procedimento, sob a luz de um microscópio de fluorescência (Zeiss-imager, M2) com uma objetiva de modo de ampliação de 40 x e acoplado um filtro AlexaFluor 488 foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (EPCs) por animal para a identificação de micronúcleos.

#### Toxicidade Oral Aguda

A avaliação da toxicidade oral aguda foi realizada de acordo com as diretrizes da Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico (OCDE) (OCDE, 2001). Camundongos em número de 10 foram divididos aleatoriamente em dois grupos de 5 animais cada: o controle negativo (GCN) composto por animais que receberam água deionizada (0,5 ml) e o grupo tratado (GOSs) que recebeu 2000 mg/kg do OAS, ambos os tratamentos por via oral (V.O). Os animais foram submetidos a um jejum de 3 horas antes da indução dos produtos e posteriormente foram pesados. As massas foram anotadas para o cálculo do peso inicial. Logo após a administração, foram observados continuamente nas primeiras duas horas pelo método de screening hipocrático, cujo objetivo foi verificar o comprometimento animal através dos seguintes parâmetros: o estado de consciência, disposição, atividade e coordenação do sistema motor e tônus muscular, atividade do sistema nervoso central a autônomo do animal. E depois a cada 24 horas por um período de 14 dias. As Avaliações diárias deram-se através da pesagem dos animais e consumo de ração.

Passados 14 dias os animais foram pesados e anestesiados com superdose anestésica de cetamina (300mg/Kg) e xilazina (30mg/Kg) intraperitoneal. Confirmada

a analgesia, foi coletado 1 ml de sangue para análise bioquímica dos seguintes parâmetros sanguíneos: albumina (ALB), nitrogênio da ureia no sangue (BUN), creatinina (CRE), aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT), colesterol total (CT), triglicerídeos (TG), proteína total (TP), fosfatase alcalina (ALP), gama-glutamil transferase (GGT) e bilirrubina (BIL). Essa coleta se deu por punção cardíaca com um auxílio de uma seringa de 1ml como procedimento terminal (endpoint).

Após esse procedimento os animais foram submetidos ao deslocamento cervical e tiveram em seguida o tórax e abdômen aberto por uma incisão longitudinal, onde os órgãos foram expostos e passaram por uma avaliação macroscópica com o objetivo de identificar possíveis patologias. Posteriormente o fígado, baço e os rins direito e esquerdo foram coletados e pesados para que fosse calculado o peso relativo de cada órgão através do cálculo determinado nos estudos de ZANG *et al.*, (2020) - com modificações- com a seguinte fórmula:  $(\text{peso do órgão}/\text{peso médio corporal}) \times 100$ . Após as pesagens, os órgãos foram imersos em formaldeído neutro tamponado a 10% por 48h, depois passaram pelo processamento histológico de rotina que consistiu em desidratar, diafanizar e incluí-los em blocos de parafina. Logo em seguida os órgãos foram cortados em um micrótomo (Leica RM2245) com cortes em espessura de 4µm, pescados com lâminas previamente untadas com albumina e corados com hematoxilina e eosina. As lâminas foram fotomicrografadas em microscópio óptico (Nikon E-200) nas objetivas de 10x -para áreas de baço- e 40x – para fígado e rim-, obtendo um total de 20 fotomicrografias por lâmina. Essas imagens foram submetidas às mensurações histomorfométricas. Através do aplicativo Image J na versão 1.8.0\_112 foi possível calcular a celularidade hepática e área nuclear dos hepatócitos, área corpuscular, glomerular e espaço de Bowman renais, e área de polpa branca, polpa vermelha e estroma esplênicos.

### Análises Estatísticas

Os dados coletados foram tabulados no Excel e encaminhados para o tratamento em programas estatísticos. A avaliação dos efeitos citotóxicos se deu através do teste estatístico de análise de variância (ANOVA) seguido por correção de Bonferroni. Para a os parâmetros relacionados a ração e peso corporal bem como os pesos dos órgãos coletados foi feito o teste de normalidade Shapiro-Wilk seguido do

teste estatístico T de Student Não pareado. Para as análises histomorfométricas relacionadas à celularidade hepática e área de hepatócito foi feito o teste de normalidade D'Agostino & Pearson com posterior teste estatístico U de Mann-Whitney. E para as análises histomorfométricas do baço e rim foi feito o teste de normalidade Anderson-Darling seguido de teste estatístico T de *Student* Não Pareado para as áreas esplênicas da polpa branca e vermelha, e o teste estatístico U de Mann Whitney para o estroma esplênico e toda a histomorfometria renal. Todas essas análises foram feitas com o pacote estatístico GraphPad Prism na versão 8.0.1. Já as análises de genotoxicidade e mutagenicidade foram feitas utilizando o programa SPSS com a verificação da normalidade através do teste Shapiro-Wilk e posterior teste T de Student Não Pareado. Para os parâmetros bioquímicos sanguíneo foi usado o teste ANOVA-Tukey. Os resultados foram expressos em Média  $\pm$  DP, sendo  $P \leq 0,05$  o valor de significância adotado.

## **Resultados**

### Análise do Perfil Lipídico do OAS

O OAS apresentou ácidos graxos de cadeia curta, média e longa, porém os ácidos graxos de cadeia média (AGCM) expressaram maior proporção na composição em relação aos outros, sendo o ácido láurico (AL) o componente majoritário, detendo 59,56% do total de AG identificados na amostra. Embora que o OAS seja composto em quase sua totalidade de AG cadeia saturada, a análise mostrou a presença do ácido linoleico e ácido oleico, e esses possuem insaturações em suas cadeias moleculares, perfazendo 4,08% dos AG (Tabela 1).

Tabela 1. Quantificação dos ácidos graxos presentes na amostra de óleo vegetal das amêndoas de *S. schizophylla*.

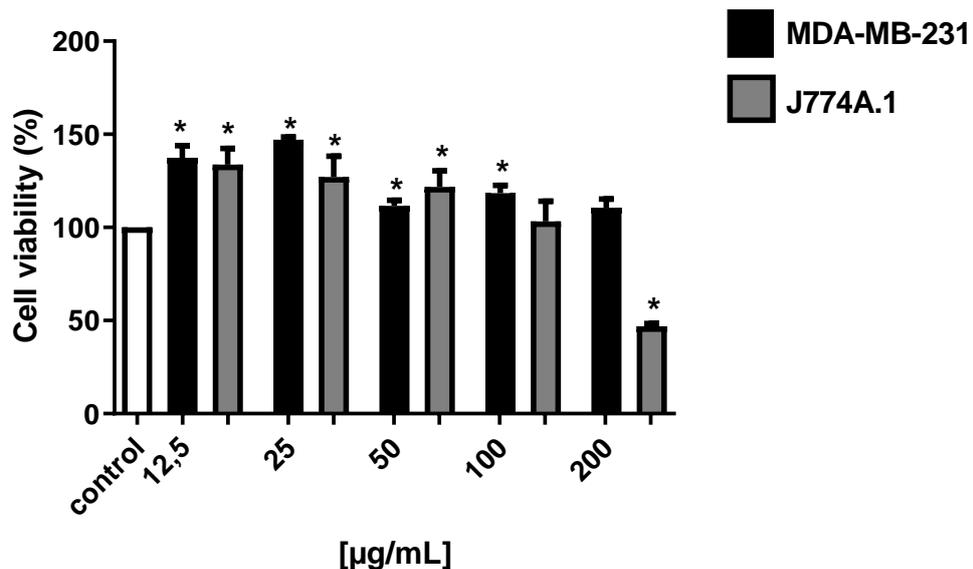
Ácidos graxos identificados	Símbolo	(%)	Desv. Pad. A(%)
Ácido caprílico	C8:0	8,32	0,07
Ácido cáprico	C10:0	9,62	0,03
Ácido láurico	C12:0	59,56	0,19
Ácido mirístico	C14:0	13,82	0,10
Ácido palmítico	C16:0	3,75	0,05
Ácido linoleico	C18:2n-6	0,80	0,03
Ácido oleico	C18:1n-9	3,28	0,07
Ácido esteárico	C18:0	0,82	0,02
<b>Total de ácidos graxos insaturados</b>	-	<b>4,08</b>	-
<b>Total de ácidos graxos saturados</b>	-	<b>95,89</b>	-
<b>Total de ácidos graxos identificados</b>	-	<b>99,97</b>	-

A análise do perfil lipídico do OAS foi realizada em triplicada. A tabela mostra as médias em percentual e seus respectivos desvio padrão.

### Ensaio de Citotoxicidade

No geral, os resultados obtidos mostraram que para ambas as linhagens celulares houve um aumento com significância estatística da viabilidade quando comparada ao grupo controle, porém observou-se um padrão de diminuição progressivo dessa viabilidade à medida que se aumentaram as concentrações do OAS na linhagem de macrófagos J744A.1 (Gráfico 1).

Gráfico 1: análises da citotoxicidade em linhagens celulares de Adenocarcinoma Humano (MDA-MB-231 e Macrófagos J774A.1) expostas a diferentes concentrações do OAS por 24h.



Dados representados em percentual da Média  $\pm$  DP da citotoxicidade de ambas as linhagens comparadas ao controle.  $P \leq 0,05^*$

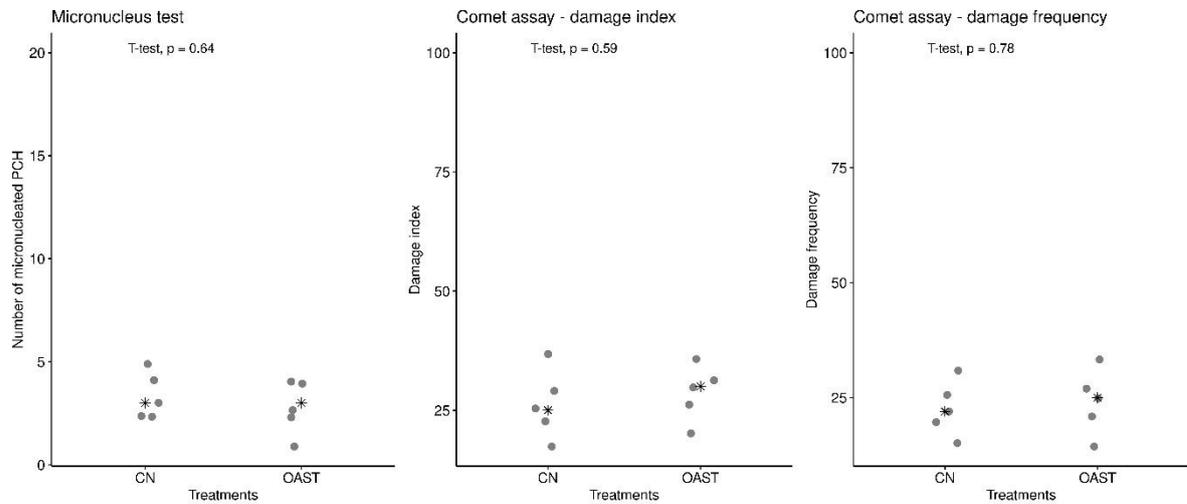
Essa diminuição afetou a linhagem macrófaga de forma mais expressiva com o uso da concentração de 200 µg/mL do OAS, onde houve citotoxicidade, detendo uma DL50 acima do limiar, embora que muito próxima de 50%. Já a linhagem celular de adenocarcinoma humano da glândula mamária MDA-MB-231 se mostrou mais resistente ao OAS quando comparada à de macrófagos J774A.1, não expressando citotoxicidade para as dosagens, e não apresentou o mesmo padrão de diminuição da viabilidade que foi visto nos macrófagos quando aumentadas as concentrações do OAS. Estudos com linhagens celulares são bem comuns, devido a sua praticidade na obtenção de dados (ROGERO *et al.*, 2003), economia de espaço, visto que o uso de animais demanda uma capacidade espacial maior (CERQUEIRA *et al.*, 2008), além de ser um ensaio que prediz sobre o potencial tóxico anteriormente ao uso de animais (SOUZA *et al.*, 2021).

#### Genotoxicidade e Mutagenicidade

Passadas 6h e 48h do período experimental, os animais foram submetidos ao EC e TMN respectivamente. O EC foi usado para a detecção de danos em leucócitos maduros. Quando feita a comparação da média do ID e FD do grupo GOSs com o GCN verificou-se que OAS não provocou alterações no ID e FD que expressassem diferença estatisticamente significativa. Por sua vez o TMN identificou danos cromossômicos através da existência de micronúcleos (MN) em eritrócitos policromáticos (EPC). Os dados coletados foram expressos em média de frequência de MN em EPC dos grupos GOSs e GCN. Verificou-se que a média de frequência de danos em EPC do grupo GOSs não apresentou diferença com significância estatística quando feita a comparação com a média de frequência de dano do grupo GCN (Gráfico 2).

Um grupo controle positivo (GCP) também foi elaborado com o uso da ciclofosfamida, substância conhecida por causar danos genéticos, o que fez com que o GCP apresentasse danos bem superiores e com significância estatística quando comparado ao GCN, permitindo dessa forma, atestar a sensibilidade do EC e TMN quanto a detecção de alterações nas frequências de MN, ID e FD.

Gráfico 2: Avaliação do perfil genotóxico do óleo das amêndoas de *S. schizophylla* (Mart.) Glassman (2000 mg/kg) V.O. Ensaio cometa 6h e teste micronúcleo 48h.



Dados apresentados como Média  $\pm$  DP. A frequência de Micronúcleos (FMN), medida pelo teste micronúcleo. A frequência de danos (FD) e índice de dano (ID) medidos pelo ensaio cometa. O valor de significância foi \*( $P \leq 0,05$ )

### Toxicidade Oral Aguda

Após a indução das substâncias, os animais foram observados quanto ao screening hipocrático, onde não foram verificadas alterações nos parâmetros avaliados bem como não ocorreram mortes. O peso final, ganho de peso e consumo de ração foram avaliados diariamente, e embora os animais do grupo GOSs tenham consumido mais ração e apresentado um ganho de massa corporal menos expressivo em comparação ao grupo GCN, essas diferenças foram irrelevantes do ponto de vista da significância estatística (Tabela 1). Feita a eutanásia, os animais tiveram o sangue coletado para as análises bioquímicas, que se mostraram dentro da normalidade ao ser comparados GOSs com GCN, mesmo que os valores relacionados à dosagem de triglicerídeos e a aspartato aminotransferase fossem os mais discrepantes entre GOSs e GCN em comparação as outras dosagens (Tabela 4). Os órgãos internos da cavidade torácica e abdominopélvica foram expostos, passaram por uma avaliação macroscópica, e não demonstraram qualquer sinal que indicasse algum processo patológico, como necrose ou hemorragia.

Tabela 2- Dados referentes a variação de peso e consumo de ração dos animais durante 14 dias após tratados com 2000 mg/kg do óleo das amêndoas de *S. schizophylla*

Parâmetro (g)	GCN	GOSs 2000 mg/kg v.o
Peso Inicial	39.76±5.481	40.64±4.251
Peso Final	41.00±1.064	40.63±0.609
Ganho de peso corporal	0.247±0.473	0.125±0.474
Consumo de ração	41.47±10.59	45.84±9.93

Os valores expressos em Média ± DP foram submetidos ao teste estatístico U de Mann-Whitney. O valor de significância estatística adotado foi \*(P≤0.05).

Anteriormente ao ensaio, foi feita uma comparação estatística sobre o peso inicial dos camundongos de ambos os grupos (tabela 2), com o objetivo de atestar se as massas iniciais não diferiam significativamente entre si a ponto de influenciarem nos resultados do peso final. Depois dessa verificação, os animais foram pesados durante os 14 dias. Feita a análise, não se verificaram alterações significantes ao comparar o peso final de GOSs com GCN.

Tabela 3- Dados referentes ao peso relativo dos órgãos retirados dos camundongos tratados durante 14 dias com 2000 mg/kg do óleo das amêndoas de *S. schizophylla*

Pesos dos órgãos (g)	GCN	GOSs 2000 mg/kg v.o
Baço	0.461±0.080	0.556±0.075
Fígado	5.664±0.777	6.173±0.423
Rim Direito	0.993±0.166	1.001±0.148
Rim Esquerdo	0.845±0.091	0.944±0.052

Os valores expressos em Média±Desvio Padrão foram submetidos ao teste estatístico U de Mann-Whitney. O valor de significância estatística adotado foi \*(P≤0.05).

Ao ser comparados os pesos relativos dos rins (direito e esquerdo), fígado e baço dos animais do GOSs com o GCN, não se verificaram alterações com significância estatística (Tabela 3). Os dados histomorfométricos referentes às mensurações: hepáticas, esplênicas e renais, não se alteraram a ponto de obter valores estatisticamente significantes quando comparadas médias do GOSs com GCN. Embora que existissem maiores alterações nas estruturas renais com mensurações superiores para GOSs em comparação ao GCN, não houve significância estatística quando comparadas as suas respectivas médias (Tabela 5).

Tabela 4: Análise bioquímica do sangue de camundongos tratados com o óleo das amêndoas de *S. schizophylla* na dosagem de 2000 mg/kg

Parameter	GCN	GOSs
Albumina (g/dL)	3.22±0.22	3.98±0.70
Alanina aminotransferase (U/L)	78.10±0.96	77.01±3.44
Aspartato aminotransferase (U/L)	111.44±2.33	117.35±7.76
Fosfatase alcalina (U/L)	11.87±0.70	10.41±1.07
Gama-glutamil transferase	11.90±0.75	10.77±1.23
Proteína Total (g/dL)	4.33±0.81	4.01±0.35
Nitrogénio uréico no sangue (mg/dL)	40.12±1.55	42.18±1.47
Creatinina (mg/dL)	0.33±0.05	0.30±0.05
Bilirrubina (mg/dL)	0.41±0.03	0.37±0.11
Colesterol total (mg/dL)	114.12±2.27	118.22±7.11
Triglicerídeos (mg/dL)	107.52±4.33	99.75±6.12

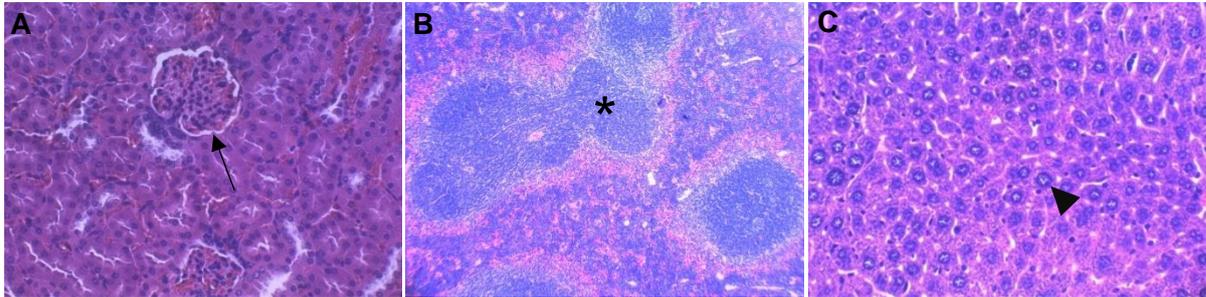
Os dados coletados estão expressos em média e desvio padrão e foram submetidos ao teste estatístico ANOVA-TUKEY adotando-se \*(P≤0.05) como nível de significância.

Tabela 5- Histomorfometria de órgãos retirados dos camundongos tratados durante 14 dias com óleo das amêndoas de *S. schizophylla*

Histomorfometria		GCN	GOSs 2000 mg/kg v.o
Baço	Polpa Branca (%)	29.11±7,97	30.13±9,48
	Polpa Vermelha (%)	70.37±8.09	69.21±9.42
	Estroma (%)	0.66±0.37	0.65±0.39
Fígado	Celularidade	100.9±11.19	100.4±9.155
	Área do Hepatócito $\mu\text{m}^2$	81.10±18.53	82.13±19.35
Rim	Área Corpuscular $\mu\text{m}^2$	3587.68±972.3	3760.91±1125.45
	Área Glomerular $\mu\text{m}^2$	2795.42±780.91	2920.96±830.29
	Espaço de Bowman $\mu\text{m}^2$	792.25± 301.23	839.96 ± 391.9

Os valores expressos em Média ± DP foram submetidos ao teste estatístico T Independente (Polpa Branca e Polpa Vermelha) e os demais ao teste U de Mann-Whitney. O valor de significância estatística adotado foi \*(P≤0.05).

Figura 1- Imagens histológicas do rim, baço e fígado de camundongos expostos a 2000 mg/kg do óleo das amêndoas de *S. schizophylla* (Mart.) Glassman



As imagens representam cortes histológicos. Em (A) o córtex renal na objetiva de 40x. A seta está apontando para o corpúsculo renal. Em (B) representando o baço. O asterisco indica a poupa branca, cercada pelo resto do conteúdo constituído maioritariamente de polpa vermelha com traços de estroma. Em (C) com aumento de 40x é possível identificar os núcleos dos hepatócitos, mostrado pela cabeça de seta.

## Discussão

A porta de entrada dos lipídeos providos da dieta é o intestino delgado, que ao receberem essas moléculas na forma de triglicerídeos as quebram em monoacilglicerol e AG pela ação de enzimas digestivas formando micelas para absorção, sendo essas incorporadas aos enterócitos com bastante eficiência, fazendo com que 95% dos lipídeos sejam absorvidos (UCHIDA *et al.*, 2013). O OAS apresentou expressiva quantidade de AG em sua composição, principalmente no que diz respeito ao teor de ácido láurico (AL) -AG de cadeia média- que se mostrou como componente majoritário na amostra analisada. Os ácidos graxos por sua vez apresentam funções que vão além daquela referente ao metabolismo oxidativo, exercendo papel nos processos que envolvem sinalização celular, expressão gênica, atividade enzimática e homeostase (RIAL *et al.*, 2010; CURRIE *et al.*, 2013).

Um estudo realizado com o uso dos ácidos graxos de cadeia média (AGCM): o ácido octnanóico, cáprico e láurico, demonstraram efeitos antioxidante em hepatócitos sob estresse provocado por  $H_2O_2$ , essa proteção ocorreu devido ao estímulo que os AGCM deram à expressão de genes antioxidantes como o Nrf2 (WANG *et al.*, 2022). Porém concentrações elevadas de AG podem provocar quadros de lipotoxicidade e isso acarreta em alterações na estrutura e função mitocondrial (LACERDA; BOCK; FUNCHAL, 2015), além de estresse ao retículo endoplasmático (NIVALA *et al.*, 2013).

Yang *et al* (2020) relatou que o uso de ácido láurico em concentrações de (0,1 – 0,25 mM) promoveu diferenciação celular, já quando utilizado na concentração de

(1 mM), foi capaz de provocar toxicidade através da diminuição da viabilidade por apoptose celular, reforçando a hipótese demonstrada aqui no estudo onde as evidências mostram uma forte influência da concentração do AG no efeito citotóxico.

É importante lembrar que o OAS é composto por diferentes AG, portanto os efeitos provocados nas células com o seu uso podem ter sido ocasionados pela combinação dos seus constituintes. Ao passo que os AGCM, como o ácido láurico, tem o potencial de promover diferenciação celular em quantidade adequadas, ácidos graxos de cadeia longa (AGCL) vêm sendo relatados na literatura como moléculas de maior perfil citotóxico quando comparados aos AGCM.

Um ensaio *in vitro* feito em células beta EndoC- $\beta$ H1, com o uso de uma combinação de AG mimetizando a composição dos óleos vegetais mais utilizados, mostrou que ao se utilizar uma mistura composta com dois grupos de AG (AGCM e AGCL), sendo os AGCM em maior proporção, os AGCM tiveram um papel atenuador dos efeitos tóxicos que os AGCL poderiam causar a essa linhagem celular se fossem utilizados de forma isolada (HANSTEIN; LENZEN; PLÖTZ, 2020).

Proporcionalmente, o OAS apresenta uma composição de AG semelhante ao descrito nesse estudo, o que reforça a ideia de uma possível combinação dos componentes do OAS -tanto AGCM quanto AGCL- que resultou em uma alta viabilidade para as células em quase todas as concentrações testadas, mesmo com os resultados da citotoxicidade apontando para uma maior sensibilidade da linhagem de macrófagos J774A.1.

Os macrófagos são células atuantes no sistema imune e sensíveis a mudanças ocasionadas por estímulos ambientais, essa sensibilidade tem a finalidade de manter a homeostase e, por sua vez, os AG livres atuam na modulação macrofágica influenciando na sobrevivência dessas células (KIM *et al.*, 2017). A diminuição progressiva da viabilidade dos macrófagos quando expostos ao OAS em concentrações crescentes, e - principalmente para a concentração de 200  $\mu$ g/mL- proveio de estresse provocado pelos componentes do óleo, isso devido a maior sensibilidade que essa linhagem celular apresenta, o que influenciou para o aspecto tóxico quando submetida à exposição ao óleo sob essa dosagem.

Já a linhagem celular MDA-MB-231 é um tipo de célula cancerígena muito agressivo e associa-se ao desenvolvimento de resistência ao tratamento (EL-ASHMAWY *et al.*, 2020), essa característica deve ter proporcionado uma maior resistência ao OAS quando comparada a linhagem macrofágica. Embora a

citotoxicidade da linhagem de macrófagos J774.A.1 tenha ocorrido acima da DL50 para a maior concentração do OAS, o que não prevaleceu como padrão em relação às outras concentrações, os experimentos in vivo como o ensaio de genotoxicidade e mutagenicidade e toxicidade oral aguda não demonstraram aspectos tóxicos ao organismo.

Os ensaios de genotoxicidade e mutagenicidade permitem verificar precocemente as manifestações genéticas ocasionadas no DNA pela exposição à alguma substância, e isso é importante uma vez que os danos tendem a aparecer tardiamente (EOCD, 2016). Esses ensaios auxiliam na elucidação dos efeitos toxinogênicos provocados por medicamentos, agrotóxicos, cosméticos e até mesmo por compostos de origem natural (TURKEZ *et al.*, 2017).

O TMN e EC são metodologias consideradas padrão para aferir o potencial genotóxico e mutagênico por apresentarem diversas vantagens como alta sensibilidade na detecção do dano, baixo custo, robustez, além de alto poder estatístico (ARALDI *et al.*, 2015). Ambas as metodologias se complementam: Enquanto o EC reconhece danos que são passíveis de reparação pelos sistemas de reparo de DNA, o TMN identifica modificações genéticas que por algum motivo não foram reparadas por esses sistemas, sendo essas modificações perpetuadas para outras células no momento da divisão (JIANG; PANDA; GEKARA, 2019; HEUSER *et al.*, 2008).

Fisiologicamente é comum que o material genético sofra algum tipo de dano influenciado por produtos reativos provenientes de processos metabólicos normais do organismo (BURCHAM, 1999). Essas modificações genéticas podem surgir ao longo da vida (HEUSER *et al.*, 2008). No gráfico 2 é possível perceber que tanto os animais do grupo GCN quanto os do grupo GOSs apresentaram algum tipo de dano quando submetidos ao EC e TMN. Como não houve diferença significativa quando comparadas as frequências de danos sofridos pelo grupo GOSs com GCN, infere-se que o grupo tratado com o OAS apresentou danos que podem ter surgido por processos fisiológicos naturais do organismo, assim como ocorreu com o grupo controle. Sendo assim, nossos estudos sugerem que o óleo fixo das amêndoas de *Syagrus schyzophylla* não apresentou atividade genotóxica ou mutagênica.

Já a toxicidade oral aguda é um ensaio que facilita o entendimento sobre os efeitos que muitas substâncias podem ocasionar ao organismo, sendo assim, caracteriza-se como uma metodologia importante para determinar a segurança

toxicológica (LI *et al.*, 2018; XIAO *et al.*, 2020). A redução de massa corpórea é um indicativo para a toxicidade sistêmica (DA SILVA *et al.*, 2016). Na Tabela 2, observa-se que o desvio padrão para o ganho de peso corporal do GCN e GOSs foi bastante disperso de suas respectivas médias. É perceptível que o ganho de peso foi baixo durante o período experimental, variando apenas em números decimais para quase todas as mensurações realizadas, que notavelmente oscilaram bastante tanto no GCN quanto no GOSs, e isso influenciou para esse alto desvio padrão entre os grupos. Como o peso final também não demonstrou diferenças significantes quando comparadas as médias dos grupos, infere-se que a variação do peso corpóreo dos animais não ocorreu por algum efeito tóxico que OAS pudesse ter provocado.

Miyagawa *et al* (2018) identificou em seus estudos que, dietas ricas em AGCM principalmente o AL na proporção de 5% e 10% tiveram efeito na diminuição da massa corporal em camundongo, já em outra dieta com AL na proporção de 2% o mesmo não provocou efeito na diminuição de peso. Quando analisado no tecido cardíaco, o AL nas proporções de (5% e 10%) provocou estresse oxidativo a esse tecido.

É possível que o AL tenha bastante influência sobre o perfil toxicológico do OAS, devido a sua posição como composto majoritário, contudo, nota-se que a quantidade desse ácido graxo presente em uma dosagem de 2000 mg/kg do OAS não foi grande o suficiente para influenciar na diminuição do peso dos animais tratados. Vale ressaltar que além do AL, o OAS apresenta outros tipos de AG, que também têm influência na sua funcionalidade.

Já para o cálculo das pesagens dos rins, fígado e baço (Tabela 3), optou-se por utilizar a massa relativa desses órgãos. É isso importante uma vez que o peso relativo considera a proporção do peso do órgão em relação a massa corpórea (PENG *et al.*, 2016) dando uma dimensão mais precisa sobre a influência da variação da massa do animal para o peso dos órgãos. Tanto a diminuição do peso corporal bem como a elevação do peso absoluto e relativo dos órgãos têm sido relacionados a efeitos tóxicos provocados por produtos químicos (MARINO, 2012). Como não foram verificadas diferenças significativas quando comparadas as massas dos órgãos entre GCN e GOSs, conclui-se que esses órgãos não foram afetados pelo OAS nessas mensurações.

Uma das formas de melhor entender possíveis alterações provocadas por moléculas exógenas ao organismo é através da observação dos parâmetros bioquímicos sanguíneos. Moléculas que circulam na corrente sanguínea, tais como:

albumina, alanina aminotransferase, aspartato aminotransferase, fosfatase alcalina, Gama-glutamil transferase, bilirrubina, são indicativos sobre a funcionalidade de órgãos como fígado, baço e rim (KOBAYASHI; SUZUKI; SUGAI, 2020; JAGDISH *et al.*, 2022; LI *et al.*, 2021; ARAÚJO *et al.*, 2005; FEVERY, 2008).

As alterações ainda podem atingir a morfologia dos órgãos, e as análises histopatológicas dão uma dimensão sobre os danos provocados (PAULIS *et al.*, 2018). Os órgãos escolhidos para o estudo da histomorfometria fazem parte ativamente da metabolização de compostos que entram no corpo, bem como a eliminação de metabólitos, e isso os torna mais susceptíveis a sofrerem danos que podem culminar em modificações nas estruturas microanatômicas (GRÜNHAGE *et al.*, 2003; HOFFMANN *et al.*, 2010). Não foram identificadas alterações tissulares quando os tecidos foram submetidos as análises histomorfométricas.

## **Conclusão**

O OAS não demonstrou sinais de toxicidade para a maioria dos parâmetros avaliados. O estudo apontou que a sua toxicidade é influenciada pela quantidade, e, ao que tudo indica pela concentração de seus fitoconstituintes, onde a dosagem de 2000 mg/kg não foi tóxica quando utilizada nos ensaios in vivo. Os resultados apontam que o óleo foi seguro quando testado in vivo. Porém estudos posteriores devem ser realizados para melhor definir o seu potencial tóxico em relação a outras variáveis. Também é importante a expansão de pesquisas com seu uso em outras espécies tidas como modelos experimentais para avaliações pré-clínicas.

## **Agradecimentos**

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), ao Projeto da Cadeia Produtiva do Licuri e ao Ministério da Ciência Tecnologia e Inovação (MCTI).

## Referências

ANVISA. **Guia Para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos.** Brasília, Vol. 2, Jan-2013.

ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy.** Vol. 72, P. 74-82, 2015. Doi:doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004.

ARAÚJO, L. M. B. et al. Associação da Gama-Glutamil Transferase e a Síndrome Metabólica em Mulheres Obesas. **Arq Bras Endocrinol Metab** vol. 49 No. 4, Agosto 2005.

BELTRAME, R. A; JASMIM, J. M; VIEIRA H. D. Morphological characterization and germination of *Syagrus schizophylla* (Mart.) Glass. (ARECACEAE). **Comunicata Scientiae.** Vol. 10, No. 1, p. 54-64, 2019. DOI: 10.14295/CS.v10i1.2997. ISSN: 2177-5133.

BURCHAM, P. C. Internal hazards: baseline DNA damage by endogenous products of normal metabolismo. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis.** Vol. 443, Issues 1–2, p. 11-36, 1999.

CASTILHO, P. F. et al. General and genetic toxicology studies of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. seeds in vitro and in vivo assays. **Journal of Ethnopharmacology,** Vol. 280, No. 114478, 2021. doi:10.1016/j.jep.2021.114478. PMID: 34343649.

CERQUEIRA, N. Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Cienc. Cult.** São Paulo. Vol. 60 No. 2, 2008. ISSN 0009-6725 Online version ISSN 2317-6660.

COLLINS, A. R., A. A. et al. The comet assay: Topical issues. **Mutagen.** Vol. 23, p. 143–51, 2008. doi:10.1093/mutage/gem051.

CURRIE, E. et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer. **Cell Metab.** Vol. 18, No.2, p. 153-61, 2013. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.017. PMID: 23791484.

DA ROCHA, L. P. B. *et al.* Uso de plantas medicinais: Histórico e relevância. **Research, Society and Development,** Vol. 10, No. 10, 2021. DOI: <http://dx.doi.org/10.33448/rsd-v10i10.18282>. ISSN 2525-3409.

DA SILVA, S. L. et al. Avaliação da toxicidade oral aguda pré-clínica do extrato metanólico das cascas do caule de *Parahancornia amapa* (Apocynaceae). **ACTA AMAZONICA.** Vol. 46, No. 1, p. 73 – 80, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1590/1809-4392201501746>.

EI-ASHMAWY, N. E. et al. Inhibition of lovastatin- and docosahexaenoic acid-initiated autophagy in triple negative breast cancer reverted resistance and enhanced cytotoxicity. **Life Sci.** Vol. 259, 2020. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118212. PMID: 32768581.

FEVERY, J. Bilirubin in clinical practice: a review. **Liver International**. Vol 28, Issue 5, p. 592-605, May 2008. ISSN 1478-3223.

GOMEZ, M; ROCHA, E. A; GOMBERG, E. Análise das publicações etnobotânicas sobre plantas medicinais da Mata Atlântica na Região Sul do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol, 10, No. 2, p. 95-219, Abr-Jun 2016. DOI 10.5935/2446-4775.20160010.

HEUSER, V. D. et al. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**. Vol. 32, No. 10, p. 1223–1229, 2008. doi:10.1016/j.cellbi.2008.07.005.

HOFFMANN, D. et al. Performance of novel kidney biomarkers in preclinical toxicity studies. **Toxicol Sci**. Vol. 116, No. 1, p. 8-22, 2010. doi: 10.1093/toxsci/kfq029. Epub 2010 Jan 29. PMID: 20118187.

ISO. **ISO 5509**: animal and vegetable fats and oils: preparation of methyl esters of fatty acids: 1-6. International Organization for Standardization, Geneva. 2002.

JAGDISH, R. K. et al. Albumin in Advanced Liver Diseases: The Good and Bad of a Drug!. **Hepatology**. Vol. 74, Issue 5, p. 2848-2862, 2022.

JIANG, H; PANDA, S; GEKARA, N. O. Comet and micronucleus assays for analyzing DNA damage and genome integrity. **Methods Enzymol**. Vol. 625, p. 299-307, 2019. doi: 10.1016/bs.mie.2019.05.015. PMID: 31455533.

JÚNIOR, V. F. V; PINTO, A. C; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, p. 519-528, 2005.

KIM, D. H. et al. Oleate protects macrophages from palmitate-induced apoptosis through the downregulation of CD36 expression. **Biochem Biophys Res Commun**. Vol. 488, No. 3, p. 477-482, 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.066. Epub 2017 May 15. PMID: 28522296.

KOBAYASHI, A; SUZUKI, Y; SUGAI, S. Specificity of transaminase activities in the prediction of drug-induced hepatotoxicity. **J Toxicol Sci**. Vol. 45, No. 9, p. 515-537, 2020. doi: 10.2131/jts.45.515. PMID: 32879252.

LACERDA, D. S; BOCK, P. M; FUNCHAL, C. Consumo Exacerbado de Lipídeos Provoca Dano Celular em algumas Doenças Metabólicas e Cardiovasculares. **Nutrire**. Vol. 40, No. 2, p. 200-213, 2015. Doi:<http://dx.doi.org/10.4322/2316-7874.41214>.

LI, J. et al. Predictive value of elevated alanine aminotransferase for in-hospital mortality in patients with acute myocardial infarction. **BMC Cardiovasc Disord** Vol. 21, No. 82, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1186/s12872-021-01903-z>.

LI, Y. et al. Safety evaluation of mulberry leaf extract: Acute, subacute toxicity and genotoxicity studies. **Regul Toxicol Pharmacol**. Vol. 95, p. 220-226, 2018. doi: 10.1016/j.yrtph.2018.03.007. Epub 2018 Mar 9.

LIMA FILHO, J. A.; MARINHO. Levantamento da diversidade e uso das plantas medicinais utilizadas por moradores do município de Puxinanã, PB, Brasil. **Gaia Scientia**. Volume Especial Populações Tradicionais: 229-249, 2014. Doi: <http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/gaia/index>. ISSN 1981-1268.

LIMA, C. M. et al. Effect of diet on the fatty acid composition of the copepod *Tisbe biminiensis*. **Journal of crustacean biology**, Vol. 33, No. 3, p. 372-381, 2013.

LORENZI, H. et al. **Palmeiras no Brasil; nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum. vol. 241, p. 303, 1996.

MARINO, D. J. Age-specific absolute and relative organ weight distributions for B6C3F1 mice. **J Toxicol Environ Health A**. Vol. 75, No. 2, p. 76-99, 2012 doi: 10.1080/15287394.2011.625548.

MIYAGAWA, Y. et al. Intake of medium-chain fatty acids induces myocardial oxidative stress and atrophy. **Lipids Health Dis**. Vol. 17, No. 1, p. 258, 2018. doi: 10.1186/s12944-018-0908-0.

MOURA, D. F. et al. Evaluation of the cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of the latex extracted from *Himatanthus drasticus* (Mart.) Plumel (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology** Vol. 253, 2020. Doi:10.1016/j.jep.2020.112567.

NIVALA, A. M. et al. Fatty acid-mediated endoplasmic reticulum stress in vivo: differential response to the infusion of Soybean and Lard Oil in rats. **Metabolism**. Vol. 62, No. 5, p. 753-60, 2013. doi: 10.1016/j.metabol.2012.12.001. PMID: 23312405; PMCID: PMC3633667.

Organisation for economic cooperation and development (OCDE). **Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals. Section 4**. OCDE Publishing, Paris, 2016.

PADILHA, M. do R. et al. *Syagrus Schizophylla*: Unconventional Food Plant of the Caatinga Biome with a high caloric value. Rev. **Geama**, Recife – Vol. 3, No. 2, p. 53-57. Abri-Jun 2017.

PAULIS, M. G. et al. Toxicological Assessment of Venlafaxine: Acute and Subchronic Toxicity Study in Rats. *International Journal of Toxicology*. 2018;37(4):327-334. doi:10.1177/1091581818777470.

PENG, W. J. et al. Evaluation of the Acute and Subchronic Toxicity of *Aster tataricus* L. F. **Afr J Tradit Complement Altern Med**. Vol. 13, No. 6, p. 38-53, 2016. doi: 10.21010/ajtcam.v13i6.8.

RATES, S. M. K. Promoção do Uso Racional de Fitoterápicos: Uma Abordagem no Ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 11, No. 2, p. 57-69, 2021.

RIAL, E. et al. Lipotoxicity, fatty acid uncoupling and mitochondrial carrier function.

**Biochim Biophys Acta.** Vol. 1797, No. 6-7, p. 800-6, 2010. doi: 10.1016/j.bbabi.2010.04.001. PMID: 20388489.

ROCHA, T. A. et al. Evaluation of cytotoxic potential, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of organic extracts of *Pityrocarpa moniliformis*. **J Toxicol Environ Health A.** Vol. 82, No. 3, p. 216-231, 2019. doi: 10.1080/15287394.2019.1576563.

ROGERO, S. O. et al. teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, Vol. 6, No. 3, p. 317-320, 2003.

SANTOS SOUZA, T. G. S. et al. Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **J Ethnopharmacol.** Vol. 272:113941, 2021. doi: 10.1016/j.jep.2021.113941. PMID: 33610703.

SANTOS, R. L. et al. Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, Vol. 13, No. 4, p.486-491, 2011.

SOUZA-MOREIRA, T. M. et al. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.** Vol. 20, No. 3, Jun./Jul.2010. ISSN 0102-695X

TURKEZ, H; ASRLLAN, M. E; OZDEMIR, O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology** Vol. 13, p. 1089-1098, 2017 - Issue 10. Doi:doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097.

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

UCHIDA, A. et al. Imaging Cytoplasmic Lipid Droplets in Enterocytes and Assessing Dietary Fat Absorption. **Methods in Cell Biology**, Vol. 116, p. 151-166, 2013. ISSN 0091-679X. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-408051-5.00014-0>.

VON HANSTEIN, A. S; LENZEN, S; PLÖTZ, T. Toxicity of fatty acid profiles of popular edible oils in human EndoC- $\beta$ H1 beta-cells. **Nutr Diabetes.** Vol. 10, No. 5, 2020. doi: 10.1038/s41387-020-0108-7.

WANG D. et al. MCFA alleviate H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced oxidative stress in AML12 cells via the ERK1/2/Nrf2 pathway. **Lipids.** Vol. 57, No. 3, p.153-162, May 2022. doi: 10.1002/lipd.12339. PMID: 35262212.

XIAO, S. et al. Acute and Subchronic Toxicities and Safety Pharmacology Studies of a *Bacillus Subtilisin* in Dogs. **Biol. Pharm. Bull.** Vol. 44, No. 2, p. 211–218, 2021. Doi: 10.1248/bpb.b20-00659.

YANG, Y. et al. The Effects of Lauric Acid on IPEC-J2 Cell Differentiation, Proliferation, and Death. **Curr Mol Med.** Vol. 20, No. 7, p. 572-581, 2020. doi: 10.2174/1566524020666200128155115. PMID: 32003670.

## 6 CONCLUSÕES

O óleo fixo das amêndoas de *Syagrus schizophylla* não induziu toxicidade quando testado em camundongos e provocou baixa toxicidade celular. Embora esse resultado tenha sido positivo, isso não torna o OAS efetivamente seguro, carecendo de estudos futuros com a observação de outras variáveis que venham a agregar conhecimento sobre os seus efeitos tóxicos ao organismo. Também é importante a expansão de pesquisas com seu uso em outras espécies tidas como modelos experimentais para avaliações pré-clínicas.

## 7 SÚMULA CURRICULAR

- Pós-Graduação: Análise Clínica e Microbiologia - Centro Universitário Faveni.
- Pós-Graduação: Ciências da Natureza e Suas Tecnologias - Universidade Federal do Piauí.
- Curso de Capacitação: Ensino Fundamental – Capacitação – Centro Universitário Faveni.
- Palestra: Biossegurança em Tempos de Pandemia
- Membro de Comissão Científica: I Congresso On-line Nacional de Saúde Multidisciplinar -I CONASMULTI.
- Revisor de trabalhos: I Congresso Nacional Multidisciplinar em Oncologia On-line -CONLAMON.
- Curso: Bioquímica – Centro Educacional Sete de Setembro.
- Curso: Fique Atento: Pode Ser Câncer - Grupo de Ajuda à Criança Carente com Câncer.
- Minicurso: Revisões de Literatura (Scoping Review E Revisão Integrativa) Como Possibilidades de Produção de Conhecimento Científico em um Contexto De Pandemia. Pro – I Congresso On-line Nacional de Ciências & Saúde -ICONCS.
- Minicurso: I Minicurso de Antibióticoterapia – Liga de Infectologia da Universidade de Brasília.
- Oficina: Passo a Passo Para uma Revisão Sistemática (Centro Acadêmico de Vitória).

## REFERÊNCIAS

- ABO-ZEID, M. A. M; ABO-ELFADL, M. T; GAMAL-ELDEEN, A. M. Evaluation of lapatinib cytotoxicity and genotoxicity on MDA-MB-231 breast cancer cell line. **Environ Toxicol Pharmacol**. Vol. 71, No. 103207, 2019. doi: 10.1016/j.etap.2019.103207. PMID: 31234033.
- AFANASIEVA, K; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophys Chem**. Vol. 238, p. 1-7, 2018. doi:10.1016/j.bpc.2018.04.003. PMID: 29704770.
- AGUIAR, S. et al. REDES-BIOMA: INFORMAÇÃO E COMUNICAÇÃO PARA AÇÃO SOCIOPOLÍTICA EM ECORREGIÕES. **Ambiente & Sociedade**. São Paulo v. XIX, n. 3. p. 233-252, jul.-set. 2016.
- ALBERTS B. DNA replication and recombination. **Nature**. Vol. 421, p. 431-5. 2003. doi: 10.1038/nature01407. PMID: 12540917.
- ALJARI, S. M. *et al.* Acute and subacute toxicity studies of a new herbal formula induced apoptosis in the highly metastatic MDA-MB-231 cells. **Journal of King Saud University - Science** Vol. 33, Issue 8, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jksus.2021.101646>
- ANVISA. **Guia Para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos**. Brasília, Vol. 2, Jan-2013.
- ANVISA. **NOTA TÉCNICA Nº 003/2009/GEMAT/GGTPS/ANVISA**. Brasília, 27 ago. 2009.
- ARALDI, R. P. et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. Vol. 72, P. 74-82, 2015. Doi:doi.org/10.1016/j.biopha.2015.04.004.
- ARAÚJO, S. M. C. *et al.* Lipídeos: classificação e principais funções fisiológicas. **REDVET Rev. Electrón**. Vol. 18, No. 8, p. 1-14, 2017. ISSN 1695-7504.
- ASSIS, M. A. et al. Florestas de restinga e de terras baixas na planície costeira do sudeste do Brasil: vegetação e heterogeneidade ambiental. **Biota Neotrop**. Vol. 11, no. 2, p. 102-121, 2011. Doi: doi.org/10.1590/S1676-06032011000200012.
- AZQUETA, A. et al. Working Group 5 of the hCOMET project (CA15132). DNA repair as a human biomonitoring tool: Comet assay approaches. **Mutat Res Rev Mutat Res**. Vol. 781, p. 71-87. 2019. doi: 10.1016/j.mrrev.2019.03.002. PMID: 31416580.
- BAKER, W. J.; DRANSFIELD, J. Beyond Genera Palmarum: progress and prospects in palm systematics. **Botanical Journal of the Linnean Society**, Oxford, v.182, n. 2, p.207– 233, 2016.
- BARCELOS, M. E. F. et al. Uma visão panorâmica sobre os solos das restingas e

seu papel na definição de comunidades vegetais nas planícies costeiras do sudeste do Brasil. **Natureza on line**. Vol. 10, No. 2, p. 71-76, 2012. ISSN 1806–7409.

BEEBY, E. *Et al.* Secondary metabolites (essential oils) from sand-dune plants induce cytotoxic effects in cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology** Vol. 258, 2020. doi.org/10.1016/j.jep.2020.112803.

BELD, J; LEE, D. J; BURKART, M. D. Fatty acid biosynthesis revisited: structure elucidation and metabolic engineering. **Mol Biosyst**. Vol. 11, No. 1, p. 38-59, Jan-2015. doi: 10.1039/c4mb00443d. PMID: 25360565; PMCID: PMC4276719.

BELTRAME, R. A; JASMIM, J. M; VIEIRA H. D. Morphological characterization and germination of *S. schizophylla* (Mart.) Glass. (**ARECACEAE**). *Comunicata Scientiae*. Vol. 10, No. 1, p. 54-64, 2019. DOI: 10.14295/CS.v10i1.2997. ISSN: 2177-5133.

BELTZIG L. et al. Cytotoxic, Genotoxic and Senolytic Potential of Native and Micellar Curcumin. **Nutrients**. Vol. 13, No. 7, 2021. doi: 10.3390/nu13072385. PMID: 34371895.

BENOV, L. Improved Formazan Dissolution for Bacterial MTT **Assay**. **Microbiol Spectr**. Vol. 9, No. 3, 2021. doi: 10.1128/spectrum.01637-21. PMCID: PMC8694201.

BRASIL. Conselho Nacional do Meio Ambiente. **Resolução nº 261, de 30 de junho de 1999**. Dispões sobre a aprovação, como parâmetro básico para análise dos estágios sucessionais de vegetação de restinga para o Estado de Santa Catarina. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 02 ago.1999. 137, p. 29-31.

BRASIL. **Lei nº 11.428, de 22 de dezembro de 2006**. Dispõe sobre a utilização e proteção da vegetação nativa do Bioma Mata Atlântica, e dá outras providências. Diário Oficial da União, Brasília, DF, 26 dez. 2006.1, p. 1.

BRUNING, M. C. R; MOSEGUI, C. B. G; DE MELO VIANNA, C. M. A utilização da fitoterapia e de plantas medicinais em unidades básicas de saúde nos municípios de Cascavel e Foz do Iguaçu – Paraná: a visão dos profissionais de saúde. **Ciência & Saúde Coletiva**, Vol. 17, No. 10, p. 2675-2685, 2012. Doi: <https://doi.org/10.1590/S1413-81232012001000017>.

CASTILHO, P. F. et al. General and genetic toxicology studies of *Aleurites moluccana* (L.) Willd. seeds in vitro and in vivo assays. **Journal of Ethnopharmacology**, Vol. 280, No. 114478, 2021. doi:10.1016/j.jep.2021.114478. PMID: 34343649.

CAXAMBÚ, M. G. et al. Palmeiras (Arecaceae) nativas no município de Campo Mourão, Paraná, Brasil. **Rodriguésia**. Vol. 66, No. 1, p. 259-270, 2015. Doi: 10.1590/2175-7860201566116.

CERQUEIRA, N. Métodos alternativos ainda são poucos e não substituem totalmente o uso de animais. **Ciência e Cultura Print version** ISSN 0009-6725Online version ISSN 2317-6660

CHOI, Y. G. Survey of the use of statistical methods in Journal of the Korean

Association of Oral and Maxillofacial Surgeons. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg.** Vol. 44, No. 1, p. 25-28, 2018. doi: 10.5125/jkaoms.2018.44.1.25. PMID: 29535966.

CNFlora. *S. schizophylla* in Lista Vermelha da flora brasileira versão 2012.2 **Centro Nacional de Conservação da Flora.** Disponível em:<<http://cnflora.jbrj.gov.br/portal/ptbr/profile/Syagrus%20schizophylla>> . Acesso em 22 dezembro 2020.

COIMBRA, M. C. **Caracterização dos Frutos e dos Óleos Extraídos da Polpa e Amêndoa de Guariroba (*Syagrus Oleracea*), Jerivá (*Syagrus Romanzoffiana*) e Macaúba (*Acrocomia Aculeata*).** Dissertação (Mestrado Engenharia e Ciência dos Alimentos)- Instituto De Biociências, Letras e Ciências Exatas Universidade Estadual Paulista. São José do Rio Preto/SP, p. 77. 2010.

CREPALDI, I. C. et al. Composição nutricional do fruto de licuri (*Syagrus coronata* (Martius) Beccari). **Revta brasil. Bot.**, São Paulo, Vol. 24, No. 2, p.155-159, jun. 2001. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0100-84042001000200004>.

CURRIE, E. et al. Cellular fatty acid metabolism and cancer. **Cell Metab.** Vol. 18, No.2, p. 153-61, 2013. doi: 10.1016/j.cmet.2013.05.017. PMID: 23791484.

D'AGOSTINI, F; ALZZOTTI, A; FLORA, S. Induction of micronuclei in cultured human lymphocytes exposed to quartz halogen lamps and its prevention by glass covers. **Mutagenesis.** 1993 Jan;8(1):87-9. doi: 10.1093/mutage/8.1.87.

DE CARVALHO MARIA, T. R. B; BIONDI, D. A Família Arecaceae na Arborização Viária de Itanhaém-São Paulo. **REVSBAU**, Curitiba – PR, Vol.13, n.4, p. 54-64, 2018. ISSN eletrônico 1980-7694. Doi: <http://dx.doi.org/10.5380/revsbau.v13i4.65102>.

DE CARVALHO, C. C. C. R; CARAMUJO, M. J. The Various Roles of Fatty **Acids. Molecules.** Vol. 23, No. 10, p. 2583, Oct. 2018. doi: 10.3390/molecules23102583. PMID: 30304860; PMCID: PMC6222795.

DE SOUZA, N. E; MATSUSHITA, M; VISENTAINER, J. V. Acidos Graxos: Estrutura e Saúde. **Arq.Apadec.** Vol. 2, No. 2, p. 102-107, jul-dez. 1998. DOI 10.22533/at.ed.704202705.

EI-ASHMAWY, N. E. et al. Inhibition of lovastatin- and docosahexaenoic acid-initiated autophagy in triple negative breast cancer reverted resistance and enhanced cytotoxicity. **Life Sci.** Vol. 259, 2020. doi: 10.1016/j.lfs.2020.118212. PMID: 32768581.

EMBORG, M. E. Reframing the perception of outliers and negative data in translational research, **Brain Research Bulletin**, Vol. 192, p. 203-207, 2023. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.brainresbull.2022.11.020>. ISSN 0361-9230.

FANG, C. T. et al. Mdivi-1 induces spindle abnormalities and augments taxol cytotoxicity in MDA-MB-231 cells. **Cell Death Discov.** Vol. 7, No 1, p. 118, 2021 doi:

10.1038/s41420-021-00495-z. PMID: 34016960.

FAORO, H. et al. Influence of Soil Characteristics on the Diversity of Bacteria in the Southern Brazilian Atlantic Forest. **APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY**, Vol. 76, No. 14, p. 4744–4749, July 2010. doi:10.1128/AEM.03025-09. PMID: 20495051.

FARIAS, P. A. M. et al. Propriedades terapêuticas de plantas do gênero *Syagrus*: uma revisão integrativa. **Brazilian Journal of Development**, Curitiba, Vol. 7, No. 8, p. 76999-77010 aug. 2021. DOI:10.34117/bjdv7n8-087. ISSN: 2525-8761

FARZAEI, M. H. et al. Poisoning by Medical Plants. **Arch Iran Med**. Vol. 23, No. 2, p.117-127, 2020. PMID: 32061075.

FERREIRA, M. L. S. M. **Bens e Serviços Associados às Fitofisionomias de Restingas em Praia das Neves, Presidente Kennedy**, Es. TCC (Engenharia Florestal) - Universidade Federal do Espírito Santo Centro de Ciências Agrárias Departamento de Ciências Florestais e da Madeira. Jerônimo Monteiro/ES, p. 5-8. 2013.

FONSCECA-KRUEL, V. S. *et al.* **Plantas Úteis Da Restinga: O Saber dos Pescadores Artesanais de Arraial Do Cabo**, Rio De Janeiro. Instituto de Pesquisas Jardim Botânico Do Rio De Janeiro. Rio de Janeiro. 2006. 42. P. ISBN: 85-60035-02-8.

GAJSKI, G; LANGIE, S; ZHANATAEV, A. Recent applications of the Comet Assay: A report from the International Comet Assay Workshop 2019. **Toxicology Letters** Vol. 333, 15, p. 1-3, 2020. Doi: doi.org/10.1016/j.toxlet.2020.07.022.

GOMEZ, M; ROCHA, E. A; GOMBERG, E. Análise das publicações etnobotânicas sobre plantas medicinais da Mata Atlântica na Região Sul do Estado da Bahia, Brasil. **Revista Fitos**, Rio de Janeiro, Vol, 10, No. 2, p. 95-219, Abr-Jun 2016. DOI 10.5935/2446-4775.20160010.

GUARDIA, M. C. et al. Crescimento de *Syagrus romanzoffiana* (Cham.) Glassman após resgate e realocação em unidade de conservação urbana. **Ci. FI.**, Santa Maria, Vol. 31, No. 1, p. 290-309, jan./mar. 2021.

GUIMARÃES, J. S. et al. Licuri (*Syagrus coronata*): características, importâncias, potenciais e perspectivas do pequeno coco do Brasil. **Desenvolv. Meio Ambiente**, Vol. 58, p. 169-192, jul./dez. 2021.

HACKE, A. C. M. *et al.* Cytotoxicity of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf fractions, essential oil, citral, and geraniol in human leukocytes and erythrocytes. **Journal of Ethnopharmacology** Vol. 291, 2022. doi.org/10.1016/j.jep.2022.115147.

HEGENBERG, L. **Normalidade estatística**. Scielo Books. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, p. 137, 1998. ISBN: 85-85676-44-2. Available from SciELO Books.

HEUSER, V. D. et al. Influence of age and sex on the spontaneous DNA damage

detected by Micronucleus test and Comet assay in mice peripheral blood cells. **Cell Biology International**. Vol. 32, No. 10, p. 1223–1229, 2008. doi:10.1016/j.cellbi.2008.07.005.

IBGE - INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Biomass e Sistema Costeiro Marinho do Brasil: Compatível Com a Escala 1:250 000**. Rio de Janeiro: IBGE, 2019. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv101676.pdf>. Acesso em: Fev. 2022.

IBGE- INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Mapa de biomass do Brasil: primeira aproximação**. Rio de Janeiro: IBGE, 2004a. Disponível em: <https://www.ibge.gov.br/geociencias/cartas-e-mapas/informacoes-ambientais/15842-biomass.html?=&t=acesso-ao-produto>. Acesso em: Jan. 2022.

Instituto de Pesquisas Jardim Botânico do Rio de Janeiro. **Plantas da Floresta Atlântica**. – Rio de Janeiro: Jardim Botânico do Rio de Janeiro, 2009. 516 p. ISBN 978-85-60035-05-2.

JIANG, H; PANDA, S; GEKARA, N. O. Comet and micronucleus assays for analyzing DNA damage and genome integrity. **Methods Enzymol**. Vol. 625, p. 299-307, 2019. doi: 10.1016/bs.mie.2019.05.015. PMID: 31455533.

JOAQUIM, L. M; EI-HANI C. N. A genética em transformação: crise e revisão do conceito de gene. **scientiæ zudia**, São Paulo, Vol. 8, No. 1, p. 93-128, 2010. JÚNIOR, V. F. V; PINTO, A. C; MACIEL, M. A. M. Plantas Medicinais: Cura Segura? **Quim. Nova**, Vol. 28, No. 3, 519-528, 2005.

Junqueira, L. C; Carneiro, J. **Histologia Básica: Texto e Atlas**. 12.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koonga, 2013.

KHALIQ, H. A. *Et al.* Effect of a methanolic extract of *Salvadora oleoides* Decne. on LPS-activated J774 macrophages, its in vitro and in vivo toxicity study and dereplication of its chemical constituents. **Toxicology Reports** .Vol. 9, p. 1742-1753, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2022.09.004>.

KIM, D. H. et al. Oleate protects macrophages from palmitate-induced apoptosis through the downregulation of CD36 expression. **Biochem Biophys Res Commun**. Vol. 488, No. 3, p. 477-482. 2017. doi: 10.1016/j.bbrc.2017.05.066. Epub 2017 May 15. PMID: 28522296.

LAHMADI, G. et al. Chemical Composition and Cytotoxic Activity of *Eucalyptus torquata* Luehm. and *Eucalyptus salmonophloia* F. Muell. Trunk Bark Essential Oils against Human SW620 and MDA-MB-231 Cancer Cell Lines. **Chem Biodivers**. Vol. 18, No. 11, 2021. doi: 10.1002/cbdv.202100315. PMID: 34705324.

LAURELES, L. R. *et al.* Variability in fatty acid and triacylglycerol composition of the oil of coconut (*Cocos nucifera* L.) hybrids and their parentals. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Davis, Vol. 50, No. 6, p. 1581-1586, 2002.

LI, W; SANCAR, A. Methodologies for detecting environmentally induced DNA

damage and repair. **Environ Mol Mutagen**. Vol. 61, No. 7, p. 664-679, 2020. doi: 10.1002/em.22365. Epub 2020 Feb 29. PMID: 32083352.

LIM, G. H. Fatty Acid- and Lipid-Mediated Signaling in Plant Defense. **Annu Rev Phytopathol**. Vol. 4, No. 55, p. 505-536, Aug. 2017. doi: 10.1146/annurev-phyto-080516-035406. PMID: 28777926.

LIMA FILHO, J. A; MARINHO. Levantamento da diversidade e uso das plantas medicinais utilizadas por moradores do município de Puxinanã, PB, Brasil. **Gaia Scientia**. Volume Especial Populações Tradicionais: 229-249, 2014. Doi: <http://periodicos.ufpb.br/ojs2/index.php/gaia/index>. ISSN 1981-1268.

LIMA, E. S. et al. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado sensu stricto no Brasil Central – DF. **Revista Brasil. Bot.**, Vol. 26, No.3, p.361-370, jul.-set. 2003.

LISTENBERGER, L. L. et al. Triglyceride accumulation protects against fatty acid-induced lipotoxicity. **Proc Natl Acad Sci EUA** . Vol. 100, No. 6, p. 3077-82. 2003. doi: 10.1073/pnas.0630588100.

LORENZI, H. et al. **Palmeiras no Brasil; nativas e exóticas**. Nova Odessa: Plantarum. vol. 241, p. 303, 1996.

LUCIO, E. M. R de A. *et al.* Avaliação toxicológica aguda e screening hipocrático da epiisopilosina, alcalóide secundário de *Pilocarpus microphyllus* Stapf. **Rev. bras. farmacogn**. Vol. 9-10 No. 1, p. 23-35, 2000. Doi: [doi.org/10.1590/S0102-695X2000000100003](https://doi.org/10.1590/S0102-695X2000000100003).

LUIJK, N. V; SOLDATI, G. T; FONSECA-KRUEL, V. S. The role of schools as an opportunity for transmission of local knowledge about useful Restinga plants: experiences in southeastern Brazil. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine** Vol. 17, No. 34, p. 1-13, 2021. Doi: <https://doi.org/10.1186/s13002-021-00461-0>.

MAGALHÃES, W. L. E et al. **Método de determinação de concentrações não citotóxicas para avaliação da capacidade protetora da lignina contra danos ao DNA**. COMUNICADO TÉCNICO 427. EMBRAPA. Colombo, PR Dezembro, 2018. ISSN 1980-3982.

MAGNAGO, L. F. S. et al. Gradiente fitosionômico-edáfico em formações florestais de Restinga no Sudeste do Brasil. **Acta bot. bras**. Vol. 24, No. 3, p. 734-746, 2010.

MAHMOUDVAND H. *et al.* Chemical composition, antileishmanial, and cytotoxic effects *Ferula macrecolea* essential oil against *Leishmania tropica*. **Parasite Epidemiology and Control**. Vol. 19, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.parepi.2022.e00270>

MAY, S. et al. Assessing Genotoxicity of Ten Different Engineered Nanomaterials by the Novel Semi-Automated FADU Assay and the Alkaline Comet Assay Nanomaterials (**Basel**). Vol. 12, No. 2, p. 220. 2022 doi: 10.3390/nano12020220.

MCOTSHANA, Z. K. S. *et al.* Cytotoxicity and antimicrobial activity of isolated compounds from *Monsonia angustifolia* and *Dodonaea angustifolia* **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 301, 2022. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2022.115170>

MEDEIROS, D. P. W. *et al.* Estrutura do Componente Lenhoso de uma Restinga no Litoral Sul de Alagoas, Nordeste, Brasil. **Revista Brasileira de Geografia Física**. Vol. 3, No. 3, p. 146-150, 2010. Doi: <https://doi.org/10.26848/rbgf.v3i3.232647>.

MEIRELES, B. R. A. **Potencial Nutricional e Antioxidante do Fruto do Catolé (*Syagrus Cearensis*)**. Tese (Doutorado em Ciências da Tecnologia de Alimentos)- Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Universidade Federal da Paraíba. João Pessoa, p. 44. 2017.

MEIRELES, B. R. L. *et al.* **Coco Catolé (*Syagrus Ceraensis*): Palmeira Nativa de Importância Socioeconômica e Nutricional do Semiárido Brasileiro**. Ponta Grossa, PR: Atena, 2020. ISBN 978-65-5706-070-4.

MELO JÚNIOR, J. C. F; BOEGER, M. R. T. Riqueza, estrutura e interações edáficas em um gradiente de restinga do Parque Estadual do Acaraí, Estado de Santa Catarina, Brasil. **Hoehnea**. Vol. 42, No. 2, p. 207-232, 5 tab., 5 fig., 2015. Doi: <http://dx.doi.org/10.1590/2236-8906-40/2014>.

MENDES, J. C.R. *et al.* Arecaceae: Uma Estratégia Diferenciada Para o Ensino de Botânica em uma Escola de Ensino Médio na Ilha de Cotijuba. **ENCICLOPÉDIA BIOSFERA**. Centro Científico Conhecer – Goiânia, Vol.16, No. 29, p. 2226, 2019. DOI: 10.18677/EnciBio\_2019A170.

MENEZES, A. F; CAVALCANTE, A. T; AUTO, P. C. C. **A Reserva da Biosfera da Mata Atlântica no Estado de Alagoas**. 2ª ed. São Paulo: Conselho Nacional da Reserva da Biosfera da Mata Atlântica. 96 p. 2010.

MIOT, H. A. Avaliação da normalidade dos dados em estudos clínicos e experimentais. **J Vasc Bras**. Vol. 16, No. 2, p. 88-91, 2017. Doi: <https://doi.org/10.1590/1677-5449.041117>.

MISHRA, P. Selection of appropriate statistical methods for data analysis. **Ann Card Anaesth**. Vol. 22, No. 3, p. 297-301, 2019. doi: 10.4103/aca.ACA\_248\_18. PMID: 31274493; PMCID: PMC6639881.

MIURA, Y. The biological significance of  $\omega$ -oxidation of fatty acids. **Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci**. Vol. 89, No. 8, p. 370-82. 2013. doi: 10.2183/pjab.89.370. PMID: 24126285; PMCID: PMC3832743.

MIYAGAWA, Y. *et al.* Intake of medium-chain fatty acids induces myocardial oxidative stress and atrophy. **Lipids Health Dis**. Vol. 17, No. 1, p. 258, 2018. doi: 10.1186/s12944-018-0908-0.

MOGHTADERI, H. *et al.* Gallic acid and curcumin induce cytotoxicity and apoptosis in human breast cancer cell MDA-MB-231. **Bioimpacts**. Vol. 8, No. 3, p. 185-194,

2018. doi: 10.15171/bi.2018.21. PMID: PMC6128975.

MONTEIRO, M. M. et al. Composição e estrutura de uma restinga arbustiva aberta no norte do Espírito Santo e relações florísticas com formações similares no Sudeste do Brasil. **Rodriguésia**. Vol. 65, No. 1, p. 061-072, 2014.

MOREIRA, N.X.; Curi, R.; Mancini Filho, J. Ácidos graxos: uma revisão. **Nutrire; rev. Soc. Bras. Alim. Nutr.= J. Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP. , Vol. 24, p.105-123, dez., 2002.

MOTTO, A. E. et al. Genotoxicity Assessment and Protective Effect of Anogeissus leiocarpus Roots against Cyclophosphamide-Induced DNA Damage In Vivo. **J Toxicol**. Vol. 2021, p. 8, 2021. doi: 10.1155/2021/8020240.

MOURA, D. F. et al. Avaliação Ponderal e Screening Hipocrático de Camundongos Tratados Com Nerolidol / Ponderal Evaluation and Hypocratic Screening of Nerolidol Treated Mice. **Brazilian Journal of Development, [S. I.]**, Vol. 6, No. 1, p. 5172–5183, 2020. DOI: 10.34117/bjdv6n1-375.

MOURA, D. F. et al. Evaluation of the cytotoxicity, oral toxicity, genotoxicity, and mutagenicity of the latex extracted from Himatanthus drasticus (Mart.) Plumel (Apocynaceae). **Journal of Ethnopharmacology** Vol. 253, 2020. Doi:10.1016/j.jep.2020.112567.

MUYLAERT, R. L. et al. UMA NOTA SOBRE OS LIMITES TERRITORIAIS DA MATA ATLÂNTICA. **Oecologia Australis**. Vol. 22, No. 3, p. 302–311, 2018. doi:10.4257/oeco.2018.2203.09.

NAGARAJAN, S. R. et al. Lipid and glucose metabolism in hepatocyte cell lines and primary mouse hepatocytes: a comprehensive resource for in vitro studies of hepatic metabolism. **Am J Physiol Endocrinol Metab**. Vol. 316, No. 4, p. E578-E589. 2019. doi: 10.1152/ajpendo.00365.2018. PMID: 30694691.

NAGHIBI, F. *Et al.* Cytotoxic activity evaluation of some medicinal plants, selected from Iranian traditional medicine Pharmacopoeia to treat cancer and related disorders. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 155, Issue 1, 8, p. 230-239, 2014. doi.org/10.1016/j.jep.2014.05.025

NASCIUTTI, P. R. et al. Ácidos Graxos e o Sistema Cardiovascular. **Enciclopédia Biosfera**, Centro Científico Conhecer - Goiânia, Vol. 11 No. 22, p. 12, 2015. DOI: [http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia\\_Biosfera\\_2015\\_066](http://dx.doi.org/10.18677/Enciclopedia_Biosfera_2015_066).

NAZER, M. R. et al. Cytotoxic and Antileishmanial Effects of Various Extracts of Capparis spinosa L. **Turk J Pharm Sci**. Vol. 18, No. 2, p. 146-150, 2021. doi: 10.4274/tjps.galenos.2020.87259. PMID: 33900699.

NELSON, D. L; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**, 4ª edição, W. H. Freeman, 2005, ISBN 978-0716743392.

NESSLANY F. The current limitations of in vitro genotoxicity testing and their relevance to the in vivo situation. **Food Chem Toxicol**. vol. 106(Pt B), p. 609-615.

2017. doi: 10.1016/j.fct.2016.08.035. PMID: 27591928.

Noblick, L. R. **Guia Para as Palmeiras do Nordeste do Brasil**. Feira de Santana : UEFS Editora, 2019. 91 p. ISBN 978-85-5592-098-1.

NOZAKI, V. T. et al. Perfil lipídico da polpa e amêndoa da guarirova. **Ciência Rural**, Santa Maria, Vol. 42, No. 8, p.1518-1523, ago, 2012. ISSN 0103-8478.

OCHWANG'I, D. O. *Et al.* Cytotoxic activity of medicinal plants of the Kakamega County (Kenya) against drug-sensitive and multidrug-resistant cancer cells. **Journal of Ethnopharmacology** Vol. 215, p. 233-240, 2018. doi.org/10.1016/j.jep.2018.01.004.

OLIVEIRA, D. M; SANTOS, L. A. S; GOMES, L. J. Uso da flora em assentamento agroextrativista do litoral de Sergipe, Brasil. **Guaju**, Matinhos, Vol. 4, No. 1, p. 163-183, jan./jun. 2018.

OLIVEIRA, K. F. *et al.* Estrutura e distribuição espacial de populações de palmeiras em diferentes altitudes na Serra do Mar, Ubatuba, São Paulo, Brasil. **Rodriguésia**. Vol. 65, No. 4, p. 1043-1055. 2014. DOI: 10.1590/2175-7860201465414.

Organisation for economic cooperation and development (OCDE). Test No. 474: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test. **OCDE Guidelines for the Testing of Chemicals**. Section 4. OCDE Publishing, Paris, 2016.

PADILHA, M. do R. et al. *S. schizophylla*: Unconventional Food Plant of the Caatinga Biome with a high caloric value. **Rev. Geama**, Recife – Vol. 3, No. 2, p. 53-57. Abri-Jun 2017.

PARVEZ, M. K; RISHI, V. Herb-Drug Interactions and Hepatotoxicity. **Curr Drug Metab.** Vol. 20, No. 4, p. 75-282, 2019. doi: 10.2174/1389200220666190325141422. PMID: 30914020.

PECOTCHE, C. B. G. **LOGOSOFIA ciência e método**: Técnica da formação individual consciente. 12. ed. – São Paulo: Logosófica, 2013. 145 p.

PEREIRA, R. V. et al. Evaluation of the chemical composition and antioxidant activity of extracts and fractions of *Ocotea notata* (Ness) Mez (Lauraceae). **Nat Prod Res.** Vol. 34, No. 20, p. 3004-3007, 2020. doi: https://10.1080/14786419.2019.1602828. PMID: 30990334.

PIFFER, P.R. et al. Ephemeral forest regeneration limits carbon sequestration potential in the Brazilian Atlantic Forest. **Glob Chang Biol.** Vol .28, No. 2, p. 630-643, Jan 2022. doi:10.1111/gcb.15944.

PINTAUD, J. C. et al. Las palmeras de América del Sur: diversidad, distribución e historia evolutiva. **Rev. peru. biol**, v. 15, n. supl 1, p. 7–029, 2008.

PIVETTA, K. F. L. *et al.* Effects of Maturation and Scarification on Seed Germination of *S. schizophylla* (Mart.) Glass. (Arecaceae). **ActaHortic.** Vol. 683, No. 48, 2005. doi:10.17660/actahortic.2005.683.4810.17660/.

RAO, M.S; REDDY, J.K. Peroxisomal beta-oxidation and steatohepatitis. **Semin Liver Dis.** Vol. 21 No. 1, p. 43-55, 2001 doi: 10.1055/s-2001-12928. PMID: 11296696.

RATES, S. M. K. Promoção do Uso Racional de Fitoterápicos: Uma Abordagem no Ensino de Farmacognosia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, Vol. 11, No. 2, p. 57-69, 2021.

REIS, R. C. C. Palmeiras (Arecaceae) das Restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta bot. bras.** Vol. 20, No. 3, p. 501-512, 2006.

REIS, R. C. C. Palmeiras (Arecaceae) das Restingas do Estado do Rio de Janeiro, Brasil. **Acta bot. bras.** Vol. 20, No. 3, p. 501-512, 2006.

ROGERO, S. O. *et al.* este in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, Vol. 6, No. 3, p. 317-320, 2003.

ROOPASHREE P.G. *et al.* Medium-Chain Fatty Acids and Breast Cancer Risk by Receptor and Pathological Subtypes. **Nutrients**. Vol. 14, No. 24, 2022. doi: 10.3390/nu14245351. PMID: 36558514.

ROSA, H. S. *et al.* Sida tuberculata: In vitro cytotoxicity and in vivo anti-inflammatory effect. **Journal of Ethnopharmacology** Vol. 287, 2022. doi.org/10.1016/j.jep.2021.114956.

ROSA, H. S. *et al.* Sida tuberculata: In vitro cytotoxicity and in vivo anti-inflammatory effect. **Journal of Ethnopharmacology** Vol. 287, 6 April 2022, 114956. doi.org/10.1016/j.jep.2021.114956.

SACRAMENTO, A. C; ZICKEL, C. S; ALMEIDA JÚNIOR, E. B. Aspectos Florísticos da Vegetação de Restinga no Litoral de Pernambuco. **R. Árvore**. Vol. 31, No. 6, p.1121-1130, 2007.

SALGADO, C. M. Noise Versus Outliers. 2016 Sep 10. In: MIT Critical Data, editor. Secondary Analysis of Electronic Health Records [Internet]. **Cham (CH): Springer**; 2016. Chapter 14. PMID: 31314268.

SANTELLI, P; CALBO, M. E. R; CALBO, A. G. Fisiologia pós-colheita de frutos da palmeira *Syagrus oleracea* (Mart.) Becc. (Arecaceae). **Acta bot. bras.** Vol. 20, No. 3, p. 523-528. 2006. Doi: <https://doi.org/10.1590/S0102-33062006000300003>.

SANTOS SOUZA, T. G. S. *et al.* Biological safety of *Syagrus coronata* (Mart.) Becc. Fixed oil: Cytotoxicity, acute oral toxicity, and genotoxicity studies. **Journal of Ethnopharmacology**. Vol. 272, p. 1-8, 2021. Doi: 10.1016/j.jep.2021.113941.

SANTOS, E. C. S; VITÓRIA, N. S. Espécies de Ascomycota em *Syagrus Coronata* (Mart.) Becc., Água Branca, Alagoas, Brasil. **Revista Ouricuri**, Paulo Afonso, Bahia, Vol.7, No.1, p.080 – 09 .jan./abr. 2017.

SANTOS, J. *et al.* Ácidos graxos como marcadores biológicos da ingestão de gorduras. **Rev. Nutr.**, Campinas, Vol. 19, No. 4, p. 489-500, jul./ago., 2006.

SANTOS, L. C. D; SANTOS LIMA, L. A. R; CASTRO, A. H. F. **Ácidos Graxos Vegetais: Composição Química, Atividade Biológica e Potencial Biotecnológico**. Trabalhos nas Áreas de Fronteira da Química 2. Ponta Grossa-PR: Atena, 2021. DOI 10.22533/at.ed.229211202. ISBN 978-65-5706-822-9.

SANTOS, R. L. *et al.* Análise sobre a fitoterapia como prática integrativa no Sistema Único de Saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.**, Botucatu, Vol. 13, No. 4, p.486-491, 2011.

SCHÖNFELD, P; WOJTCZAK L. Short- and medium-chain fatty acids in energy metabolism: the cellular perspective. **J Lipid Res.** Vol. 57, No. 6, p. 943-54, 2016. doi: 10.1194/jlr.R067629. PMID: 27080715.

SILVA JÚNIOR, F. M. R. *et al.* Genetic damage in coal and uranium miners. **Mutation Research** Vol, 866, June 2021. doi.org/10.1016/j.mrgentox.2021.503348.  
SOARES, K. P. *et al.* Duas Novas Espécies de *Syagrus* Mart. (Arecaceae) Para o Brasil. **Ciência Florestal**, Santa Maria, Vol. 23, No. 3, p. 417-426, jul.-set., 2013. ISSN 0103-9954.

SOARES, K. P. *et al.* Palmeiras (Arecaceae) no Rio Grande do Sul, Brasil. **Rodriguésia**. Vol. 65, No. 1, p. 113-139, 2014. Doi: <https://doi.org/10.1590/S2175-78602014000100009>.

SOARES, Z. T. *et al.* Caracterização e riqueza etnobotânica da família Arecaceae para o Sudoeste Maranhense. **Braz. J. of Develop.**, Curitiba - PR, v. 6, n. 9, p. 67274-67289 sep. 2020. ISSN 2525-8761.

SODRÉ, J. B. **Morfologia das Palmeiras Como Meio de Identificação e Uso Paisagístico**. Monografia (Especialização em Plantas Orientais e Paisagismo) – Universidade Federal de Lavas- Minas Gerais, p. 5. 2005.

SOMMER, S; BURACZEWSKA, I; KRUSZEWSKI, M. Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions. **Int J Mol Sci.** Vol. 24;Vol. 21, No. 4, 2020. doi: 10.3390/ijms21041534.

SOUZA, C. R. G. *et al.* **“Restinga” Conceitos e Empregos do Termo no Brasil e Implicações na Legislação Ambiental**. 1ª ed. São Paulo: Instituto Geológico, 2008. 104 p. ISBN: 978-85-87235-04-6.

SOUZA-MOREIRA, T. M. *et al.* O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacogn. Braz. J. Pharmacogn.** Vol. 20, No. 3, Jun./Jul.2010. ISSN 0102-695X.

TEIXEIRA, J. P. S. Perfil epidemiológico dos casos de intoxicação por plantas medicinais no Brasil de 2012 a 2016. **Braz. J. of Develop**, Curitiba, Vol. 6, No. 10, p. 82199-82209, oct.2020. ISSN 2525-8761.

THIESE, M. S; ARNOLD, Z. C; WALKER, S. D. The misuse and abuse of statistics in

biomedical research. **Biochem Med (Zagreb)**. Vol. 25, No. 1, p. 5-11, 2015. doi: 10.11613/BM.2015.001. PMID: 25672462.

TURKEZ, H; ASRLLAN, M. E; OZDEMIR, O. Genotoxicity testing: progress and prospects for the next decade. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology** Vol. 13, p. 1089-1098, 2017 - Issue 10. Doi:doi.org/10.1080/17425255.2017.1375097.

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

TVRZICKA, E. et al. Fatty acids as biocompounds: their role in human metabolism, health and disease--a review. Part 1: classification, dietary sources and biological functions. **Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub**. Vol. 155, No. 2, p. 117-30, 2011. doi: 10.5507/bp.2011.038.

UCHIDA, A. et al. Imaging cytoplasmic lipid droplets in enterocytes and assessing dietary fat absorption. **Methods Cell Biol**. Vol, p. 116:151-66. 2013 doi: 10.1016/B978-0-12-408051-5.00014-0. PMID: 24099292.

VALADARES, M. C. Avaliação de Toxicidade oral aguda: Estratégias Após a “Era do Teste DI50”. **Revista Eletrônica de Farmácia** Vol. 3, No. 2, p. 93-98, 2006.

VIZZOTTO, M.; KROLOW, A. C.; WEBER, G. E. B. **Metabólitos Secundários Encontrados em Plantas e sua Importância**. Documento 316. Pelotas- RS, nov. 2010. ISSN 1516-8840.

WAGNER FH. The flowering of Atlantic Forest Pleroma trees. **Sci Rep**. Vol. 11, No. 1, p. 20437. Oct. 2021. doi:10.1038/s41598-021-99304-x.

WYNN, T; CHAWLA, A; POLLARD, J. Macrophage biology in development, homeostasis and disease. **Nature**. Vol. 496, p. 445–455, 2013. <https://doi.org/10.1038/nature12034>.

YANG, Y. et al. The Effects of Lauric Acid on IPEC-J2 Cell Differentiation, Proliferation, and Death. **Curr Mol Med**. Vol. 20, No. 7, p. 572-581, 2020. doi: 10.2174/1566524020666200128155115. PMID: 32003670.

ZANG, H. et al. Acute Oral Toxicity and Acute Intraperitoneal Studies of Thermally Treated Ceftiofur. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**. Vol. 68 Issue 11, p. 1061-1068, 2020. DOI <https://doi.org/10.1248/cpb.c20-00483>.

ZHAO, Y. et al. Cytotoxicity enhancement in MDA-MB-231 cells by the combination treatment of tetrahydropalmatine and berberine derived from *Corydalis yanhusuo* W. T. Wang. **J Intercult Ethnopharmacol**. Apr-Jun;Vol. 3, No. 2, p. 68-72, 2014 doi: 10.5455/jice.20140123040224. PMID: 26401350