

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE
AGROPECUÁRIA

Avaliação do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* (bocaiuva) na
prevenção da lesão hepática aguda em camundongos.

Autora: Aline da Rosa Gonçalves Taveira
Orientadora: Prof.^aDr^a Susana E. Moreno

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Julho-2023

UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO STRICTO SENSU EM
CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE
AGROPECUÁRIA

Avaliação do óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* (bocaiuva) na
prevenção da lesão hepática aguda em camundongos.

Autora: Aline da Rosa Gonçalves Taveira
Orientadora: Prof.^aDr^a Susana E. Moreno

"Tese apresentada, como parte das exigências para obtenção do título de DOUTOR EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SUSTENTABILIDADE AGROPECUÁRIA no Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária da Universidade Católica Dom Bosco. Área de concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva aplicada à Saúde, Ambiente e Sustentabilidade.

Campo Grande
Mato Grosso do Sul
Julho-2023

T232a Taveira, Aline da Rosa Gonçalves
Avaliação do óleo da polpa da Acrocomia aculeata (bocaiuva)
na prevenção da lesão hepática aguda em camundongos/
Aline da Rosa Gonçalves Taveira sob orientação da
Profa. Dra. Susana Elisa Moreno.-- Campo Grande, MS
: 2023.
102 p.: il.

Tese (Doutorado em Ciências Ambientais e Sustentabilidade
Agropecuária) - Universidade Católica Dom Bosco, Campo
Grande- MS, 2023
Bibliografia: p. 47- 65

1. Óleo vegetal. 2. Hepatite aguda não alcoólica.
3. Macaúba I.Moreno, Susana Elisa. II. Titulo.

CDD: 619.93



**Avaliação do Óleo da Polpa da *Acrocomia aculeata* (bocaiuva) na
Prevenção da Lesão Hepática Aguda em Camundongos**

Autora: Aline da Rosa Gonçalves Taveira
Orientadora: Profa. Dra. Susana Elisa Moreno
Coorientador: Bruno Cagliati

TITULAÇÃO: Doutora em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária
Área de Concentração: Sustentabilidade Ambiental e Produtiva.

APROVADA em 04 de agosto de 2023

Profa. Dra. Susana Elisa Moreno – UCDB

Profa. Dra. Ângela Alves Nunes – UNIGRAN

Profa. Dra. Danielli Fernanda Buccini – UCDB

Profa. Dra. Magyda Arabia Araji Dahroug Moussa – UCDB

Profa. Dra. Renata Trentin Perdomo – UFMS

RESUMO

A doença hepática refere-se ao quadro em que se observam danos às células, tecidos, estrutura ou função do órgão. Esse dano pode ser induzido por fatores biológicos (bactérias, vírus e parasitas), doenças autoimunes, bem como pela ação de diferentes substâncias químicas, como a lesão hepática induzida por drogas (DILI), que pode apresentar diferentes graus de lesões e manifestações clínicas, variando entre a fase assintomática até quadros mais graves que evoluem para insuficiência hepática aguda. A medicina apresenta avanços significativos na busca de novos fármacos; entretanto, a busca por novos compostos capazes de prevenir completamente lesões hepáticas ainda é alvo de grande interesse, sendo os produtos derivados de plantas alternativas promissoras. O óleo da polpa da *Acrocomia aculeata* (bocaiuva) é um fruto rico em constituintes como ácidos graxos poli-insaturados e carotenoides, providos de atividade anti-inflamatória e antioxidante, sugerindo potencial efeito protetor na lesão hepática. O presente trabalho objetivou avaliar o efeito do óleo da polpa de bocaiuva (OPB) na prevenção da lesão hepática aguda induzida por acetaminofeno (ACF) em camundongos. Para tanto, foi extraído o óleo da polpa dos frutos de bocaiuva e posterior caracterização físico-química. Camundongos da linhagem C57 black foram pré-tratados com 50 μ L de OPB por gavagem durante sete dias, enquanto os grupos controles receberam solução salina no mesmo volume. No oitavo dia, os animais receberam 300 mg/Kg de acetaminofeno i.p. O controle negativo recebeu salina 0,9% i.p. Após 24 horas da administração de ACF, os animais foram eutanasiados, e foi coletado sangue e fígado para as análises. No capítulo 1 trazido como artigo, visa avaliar o efeito do OPB na prevenção da lesão hepática aguda em camundongos, no qual obtivemos resultados promissores para o seu uso em prevenção de lesões hepáticas agudas não alcóolicas.

Palavras chave: óleo vegetal, hepatite aguda não alcoólica, macaúba.

ABSTRACT

Liver disease refers to the condition in which damage to the cells, tissues, structure or function of the organ is observed. This damage can be induced by biological factors (bacteria, viruses and parasites), autoimmune diseases, as well as by the action of different chemical substances, such as drug-induced liver injury (DILI), which presents different degrees of injury and clinical manifestations, from asymptomatic to more severe conditions that progress to acute liver failure. Medicine has made significant advances in the search for new drugs; however, the search for new compounds capable of completely preventing liver damage is still a target of great interest, with plant-derived products promising alternatives. The pulp oil of *Acrocomia aculeata* (bocaiuva) is a fruit rich in constituents such as polyunsaturated fatty acids and carotenoids, provided with anti-inflammatory and antioxidant activity, suggesting a potential protective effect on liver damage. The present work aimed to evaluate the effect of bocaiuva pulp oil (OPB) in the prevention of acute liver injury induced by acetaminophen (ACF) in mice. For this purpose, oil was extracted from the pulp of bocaiuva fruits and subsequent physicochemical characterization. Mice of the C57 black-6 strain were pre-treated with 50µL of OPB by gavage for seven days, while the control groups received saline solution in the same volume. On the eighth day, the animals received 300 mg/Kg of acetaminophen i.p. The negative control received 0.9% saline i.p. After 24 hours of ACF administration, the animals were euthanized, and blood and liver were collected for analysis. In chapter 1 brought as an article, it aims to evaluate the effect of OPB in the prevention of acute liver injury in mice, in which we obtained promising results for its use in the prevention of non-alcoholic acute liver injuries.

Keywords: vegetable oil, non-alcoholic acute hepatitis, macaw palm.

Dedico esse trabalho a minha filha Aurora, que ainda no ventre já me faz uma pessoa mais forte, com muita esperança de um mundo melhor para todos.

Você é a razão da minha vida agora minha filha, te amo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela minha vida, por ter me dado força e persistência para seguir na pós graduação.

Agradeço em especial a minha orientadora, Dra. Susana Elisa Moreno, primeiro por acreditar em mim e por sempre estar do meu lado nas tomadas de decisões e na execução do trabalho.

Agradeço meu Coorientador Dr. Bruno Cogliati, por todo ensinamento na parte de indução do nosso modelo de hepatite aguda, um grande profissional sempre disposto a ajudar.

Agradeço muito a Dra. Ângela Alves Nunes, uma pessoa fundamental nesse trabalho, a profissional que me ensinou a extrair o óleo da bocaiuva, me deu apoio em todo tempo de preparação e na realização dos testes físico-químicos no nosso óleo.

Agradeço a Dra. Danieli Buccini, meu braço direito dentro do laboratório, uma grande profissional que compartilhou comigo toda sua experiência com experimentação animal e ensaios laboratoriais, sempre presente nas experimentações desse trabalho.

Agradeço a todos os meus colegas do laboratório de farmacologia e mutagênese (graduação, mestrado e doutorado) pela ajuda em todos os momentos experimentais dessa pesquisa.

Agradeço ao meu esposo Joao Pedro Taveira, por todo apoio durante minha pós graduação, em momentos difíceis ele sempre esteve ao meu lado dizendo que tudo iria dar certo, também foi a pessoa responsável pela coleta da matéria prima do nosso óleo, muito obrigada meu amor.

Agradeço aos meus colegas de doutorado e amigos médicos veterinários, Joyce Katiuccia e Alexandre Bezerra, pelo apoio em todos os momentos dessa fase que compartilhamos.

Agradeço a minha amiga e colega de profissão Taynara N. P. Lourenço por sempre estar disposta a me ajudar e me orientar na escrita do trabalho.

Agradeço aos demais amigos e familiares que sempre acreditaram que eu seria capaz de encerrar de forma positiva essa etapa da minha vida.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL	17
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo Geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3. REVISÃO DE LITERATURA	21
3.1 Doenças hepáticas	21
3.1.1 Doença hepática aguda em animais	22
3.1.2 Lesão hepática induzida por drogas (<i>DILI</i>)	24
3.1.3 Lesão hepática induzida por acetaminofeno (<i>paracetamol</i>)	26
3.2 Produtos de origem vegetal na prevenção e tratamento da doença hepática	27
3.2.1 <i>Acrocomia aculeata</i> (Jacq) (<i>Bocaiuva</i>)	28
3.2.2 Óleo da polpa de bocaiuva	32
4. MATERIAL E MÉTODOS	36
4.1 Obtenção dos frutos de <i>A. aculeata</i>	36
4.2 Obtenção do óleo da polpa da bocaiuva (OPB)	36
4.3 Caracterização físico-química do OPB	37
4.3.1 Índice de acidez	37
4.3.2 Índice de peróxido	39
4.3.3 Índice de iodo	40
4.4 Ensaios Biológicos com OPB	41
4.4.1 Animais	41
4.4.2 Divisão dos grupos amostrais	42
4.5 Indução da lesão hepática aguda	42
4.5.1 Padronização do método de indução de lesão hepática aguda	42
4.6 Delineamento experimental	43
4.6.1 Avaliação do efeito do OPB no tratamento da lesão hepática aguda	43
4.6.2 Avaliação do efeito do OPB na prevenção da lesão hepática aguda	43
4.6.3 Coleta de amostras biológicas	43
4.7 Determinação do impacto da prevenção com OPB sobre o peso dos animais	43
4.8 Determinação do impacto do OPB sobre o peso e dimensão do fígado de animais submetidos a lesão hepática induzida por acetaminofeno	43
4.9 Análises séricas da alanina aminotransferase (ALT)	44
4.10 Análises Biológicas para Determinação do impacto do OPB sobre a arquitetura e função renal	44

4.10.1 Avaliação histopatológica e quantificação da lesão hepática	44
4.11 Análise da glicemia	45
4.12 Teste do micronúcleo em eritrócitos	45
4.13 Analise estatística	46
REFERENCIAS	47
CAPÍTULO 1	66
Artigo 1 - Efeito do óleo da polpa da <i>Acrocomia aculeata</i> (bocaiuva) na prevenção da lesão hepática aguda em camundongos	66

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do paracetamol formada por um grupamento hidroxila ligado a um benzeno e uma amida ligado a um radical acila	21
Figura 2: Palmeiras de <i>A. aculeata</i>	25
Figura 3: Estruturas do fruto da bocaiuva.....	25
Figura 4: Partes da bocaiuva e suas aplicações.....	26
Figura 5: Obtenção dos frutos de bocaiuva; a- Palmeiras utilizadas para colheita do fruto de bocaiuva; b- seleção dos frutos, seta representa fruto ideal.....	30
Figura 6: Obtenção da polpa de bocaiuva; a- despolpamento manual do fruto de bocaiuva; b- secagem da polpa em estufa.....	31
Figura 7: Obtenção do óleo da polpa de bocaiuva; a- extração do óleo realizada pelo Soxhlet; b- remoção do solvente pelo rotovaprador; c- óleo bruto da polpa de bocaiuva.....	32
Figura 8: Análise das amostras; a- pesagem da amostra para caracterização; b- análise titulométrica das amostras.....	36
Figura 9: Representação esquemática da divisão dos grupos amostrais.....	37

Capítulo 1

Figura 1: Efeito do OPB no peso dos camundongos. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ L/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Os controles negativos receberam salina 0,9% (50 μ L i.p.). Os animais foram pesados no primeiro e oitavo dia do experimento.

Os resultados estão expressos em gramas (g) (media ±EPM) # p<0,05 quando comparado ao grupo salina (controle negativo). ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.....66

Figura 2: Efeito do OPB no peso e dimensão do fígado de camundongos. O efeito hepatoprotetor do OBP foi avaliado em camundongos C57BL-6 (n=8) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50µL/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Os controles negativos receberam salina 0,9% (50µL i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados os fígados foram retirados pesados (figura a) e mensurados (figura b). Os resultados estão expressos em gramas e milímetro (mm) (media ±EPM) # p<0,05 quando comparado ao grupo salina (controle negativo). * <0,05 quando comparado ao grupo com lesão e não pré tratados. ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.....68

Figura 3: Efeito do OPB nos níveis séricos de ALT na lesão hepática em camundongos. O efeito hepatoprotetor do OBP foi avaliado em camundongos C57BL-6 (n=8) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50µL/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Os controles negativos receberam salina 0,9% (50µL i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e quantificados os níveis séricos da alanina aminotransferase (ALT). Os resultados estão expressos em U/dL (media ±EPM) # p<0,05 quando comparado ao grupo salina (controle negativo). ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.....69

Figura 4: Efeito do OPB na arquitetura hepática. O efeito hepatoprotetor do OBP foi avaliado em camundongos C57BL-6 (n=8) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50µL/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Os controles negativos receberam salina 0,9% (50µL i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e os fígados foram retirados para análise macroscópica. As fotos foram capturadas com câmera Canon.....70

Figura 5: Efeito do OPB na microscopia hepática. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 (n=8) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50µL/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e porções dos fígados foram preparadas para análise histológica; a- grupo controle negativo, morfologia normal do tecido hepático; b- grupo lesão hepática + pré tratamento com OPB, desorganização trabecular difusa com vacuolização citoplasmática moderada dos hepatócitos (setas) com arquitetura hepática preservada; c- grupo lesão hepática não pré tratados, acentuada necrose hepática centrolobular com pontes centro-centrais (setas). (HE, 100x, barra 100 µm)71

Figura 6: Efeito do OPB na fotomicrografia hepática. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 (n=8) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50µL/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e porções dos fígados foram preparadas para análise histológica; a e b- grupo lesão sem pré tratamento, necrose hepática difusa evidenciada nas áreas brancas das imagens avaliadas por meio do software Image J72

Figura 7: Efeito do OPB na quantificação da lesão hepática. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 (n=8) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50µL/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e porções dos fígados foram preparadas para análise histológica. Os resultados estão expressos em porcentagem de área de necrose (media ±EPM) # p<0,05 quando comparado ao grupo salina (controle negativo). * p<0,05 quando comparado ao grupo com lesão e não pré tratados. ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.....73

Figura 8: Efeito do OPB na glicemia dos animais. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 (n=8) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50µL/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p). A glicemia dos animais foi mensurada no

primeiro e oitavo dia do experimento. Os resultados estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL) (media \pm EPM) # $p<0,05$ quando comparado ao grupo salina (controle negativo). ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.....74

Figura 9: Efeito do OPB no teste de micronúcleo. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 (n=8) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ L/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). O teste de micronúcleo foi analisado a partir de lâminas confeccionadas com uma gota de sangue periférico dos camundongos. Os resultados estão expressos em gramas e milímetro (mm) (media \pm EPM) # $p<0,05$ quando comparado ao grupo salina (controle negativo). * $<0,05$ quando comparado ao grupo com lesão e não pré tratados. ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.....75

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Casos registrados de intoxicação humana e de intoxicação animal e de solicitação de informação por agente tóxico no Brasil.....	27
Tabela 2: Parâmetros de qualidade e identidade do óleo bruto da polpa de bocaiúva.....	66

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- OPB - óleo da polpa de bocaiuva
CCl₄ - tetracloreto de carbono
LPS - lipopolissacarídeo
ALT - alanina aminotransferase
AST - aspartato aminotransferase
DNA - ácido desoxirribonucleico
IL-1 β - *interleucina 1 β*
IL-10 - *interleucina 10*
IFN- γ - Interferon-gama
IL-6 - *interleucina 6*
TNF- α - fator de necrose tumoral alfa
NF- κ B - factor nuclear kappa B
JAK2 - via Janus kinase 2
STAT3 - transdutor de sinal e ativador de transcrição 3
JNK/p38 - Jun N-terminal kinase
MAPK - mitogen activated protein kinases
SOD - enzima superóxido dismutase
GSH-Px - selenoenzima glutationa peroxidase
CD68 - glicoproteína transmembranar tipo I
AOCS - American Oil Chemists' Society
AOAC - Association of Official Analytical Chemists
KOH - hidróxido de potássio
KI - iodeto de potássio
CONCEA - Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal
CEUA - Comitê de Ética no Uso de Animais
PBS - phosphate buffered saline
ip - intraperitoneal
VO - via oral
Xg - Força Gravitacional
H₂O₂ - peróxido de hidrógeno
EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

HRP - *horseradish peroxidase*

IA - índices de acidez

IP - índices de peróxido

meqO₂ - miliequivalente de oxigênio ativo

APRESENTAÇÃO

Os resultados que fazem parte deste trabalho estão apresentados sob a forma de artigo.

As primeiras referências referem-se somente às citações que aparecem nos itens Introdução e Revisão Bibliográfica deste trabalho.

As seções Material e Métodos, Resultados e Discussão e Referências encontram-se no próprio artigo e representa o objetivo deste estudo.

O item Conclusão, encontrado no final deste trabalho, apresentam as considerações gerais sobre os resultados obtidos.

O artigo está estruturado de acordo com as normas da revista científica a qual iremos submete-lo.

Artigo 1: Phytomedicine International Journal of Phytotherapy and Phytopharmacology

1. INTRODUÇÃO GERAL

O fígado é um órgão vital e desempenha várias funções importantes no organismo, que incluem o processamento e metabolismo de carboidratos, lipídios e proteínas, além de regular os níveis sanguíneos de glicose e sintetizar lipídios e proteínas essenciais para o funcionamento do organismo (DYCE et al., 2004). As disfunções hepáticas são caracterizadas por distúrbios nos níveis de glicose, lipídios e proteínas no sangue. Isso pode levar a condições como diabetes, dislipidemia e desnutrição, além do acúmulo de substâncias nocivas no organismo e causar danos em outros órgãos e sistemas, bem como aumentar o risco de intoxicações (LLOVET et al., 2021).

A lesão hepática aguda é reconhecida como um fator iniciador e um caminho comum para inúmeras doenças hepáticas, que progride para a insuficiência hepática terminal, a lesão hepática de longa duração geralmente leva a fibrose hepática, cirrose e até câncer de fígado, e essas doenças ter um impacto sério no corpo, pode- se dizer que a lesão hepática ameaça seriamente a saúde (LI et al., 2019).

A hepatite medicamentosa ou lesão hepática induzida por drogas (DILI) é responsável por grande parte dos quadros de hepatite aguda, causando danos hepáticos variáveis ocasionado após administração de um determinado composto em sua dose habitual, podendo se desenvolver entre um e noventa dias após a administração da droga, ocasionando quadros variáveis compostos por alterações de enzimas hepáticas assintomáticas até insuficiência hepática aguda grave, caracterizada por quadro clínico dramático, podendo levar à morte (BARROS et al., 2018). Muitas pesquisas vêm utilizando o modelo experimental de intoxicação por acetaminofeno (paracetamol) a fim de estudar novos compostos. Logo, esse modelo de toxicidade tornou-se um dos métodos mais populares para o estudo de potenciais agentes hepatoprotetores, especialmente de alguns produtos naturais (JAESCHKE et al., 2011)

Em animais isso pode ser mais agravado pelo fato de que os sinais clínicos de doenças hepáticas podem não ser evidentes enquanto não houver o comprometimento de pelo menos 60 a 80% do parênquima hepático, e as principais manifestações clínicas observadas geralmente são icterícia,

encefalopatia hepática, edema, diarreia, constipação, fotossensibilização, diátese hemorrágica e dor abdominal (RADOSTITS et al., 2002; DAVOUDI et al., 2013).

Atualmente existem várias abordagens terapêuticas em estudo, porém nenhuma é definitiva como tratamento ou prevenção a esse distúrbio. Nesse contexto, a identificação de novas substâncias ou estratégias para o tratamento das doenças hepáticas é imperativa. Uma fonte expressiva de novos compostos são os de origem vegetal (FALUDI et al., 2017).

Os benefícios dos óleos vegetais para a saúde humana e animal há muito tempo é foco de investigações, principalmente nas últimas décadas, devido à substituição de gordura de origem animal na alimentação, alguns desses óleos, apresentam comprovadas propriedades benéficas para a saúde humana, devido à presença de compostos antioxidantes, como polifenóis, tocoferóis (POVEDA et al., 2005; COVAS et al., 2006; JU et al., 2010) e ácidos graxos como o oleico e linoleico (ESTRUCH et al., 2006).

O fruto de *Acrocomia aculeata* (Jacq.) conhecido como bocaiuva é amplamente consumido, no entanto, suas propriedades terapêuticas ainda não estão completamente elucidadas. Os frutos da bocaiuva são ricos em compostos antioxidantes como flavonoides, carotenoides e tocoferóis, e o perfil de ácidos graxos do óleo de polpa de bocaiuva (OPB) é composto principalmente por ácido oleico (COIMBRA & JORGE, 2011; NUNES et al., 2018; COSTA et al., 2020). Essa composição sugere que OPB possa ter importantes impactos na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, metabólicas, e de caráter inflamatório e oxidativo, como as doenças hepáticas.

Neste contexto já foi demonstrado que o óleo da castanha da *A. aculeata* apresenta efeitos hipoglicemiantes, diminuição do ganho de peso, redução dos níveis séricos de colesterol e da deposição de ácidos graxos de cadeia média no tecido adiposo epididimal em ratos diabéticos, sugerindo que o óleo de *A. aculeata* é uma promissora fonte de energia em dietas para pacientes com diabetes mellitus tipo 2 (ARENA et al., 2018; NUNES et al., 2018; DA SILVA, et al., 2019). Estudos realizados também já revelaram que o OPB é provido de propriedades anti-inflamatórias, antimutagênicas e quimioprotetores, provavelmente associadas à ação antioxidant do OPB, explicada por sua constituição fitoquímica, como ácidos graxos, em especial o ácido oleicos e

compostos como os carotenoides, visto que as doenças hepáticas estão associadas ao estresse oxidativo, respostas inflamatórias exacerbadas e comprometimento da homeostase metabolismo energético (LI et al., 2017; ROMUALDO et al., 2021), a propriedades farmacológicas do OPB já descritas sugerem que este possa representar um importante recurso para a prevenção e tratamento de lesões hepáticas.

Assim, o presente projeto propõe avaliar o efeito da prevenção da lesão hepática aguda com o uso de OPB em camundongos submetidos a protocolos de lesão hepática aguda induzidos por acetaminofeno. O OPB apresenta potencial promissor como óleo vegetal inovador por seu baixo custo, propriedades farmacológicas diversas e propósitos nutricionais versáteis. Os resultados deste projeto poderão agregar valor à cadeia produtiva da bocaiuva no Mato Grosso do Sul, contribuir para o crescimento da bioeconomia local e estimular a criação de produtos inovadores voltados à segurança alimentar e à saúde humana e animal.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Investigar o potencial efeito do OPB na prevenção da lesão hepática aguda não alcoólica por acetaminofeno em camundongos.

2.2 Objetivos Específicos

- Obtenção do OPB;
- Caracterização físico-química do OPB (índices de acidez, índices de peróxido, índices de iodo);
- Avaliar o efeito do OPB no peso dos camundongos induzidos a lesão hepática aguda;
- Avaliar o efeito do OPB no peso e na dimensão do fígado de camundongos induzidos a lesão hepática aguda;
- Investigar o potencial efeito do OPB na prevenção da lesão hepática aguda induzidas por acetaminofeno em camundongos;
- Avaliar os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e glicose em animais submetidos a lesão hepática aguda e pré tratados com OPB;
- Avaliar o efeito genotóxico do OPB através do teste de micronúcleo em animais induzidos a lesão hepática aguda;
- Avaliar histologicamente o efeito do OPB sobre o processo inflamatório na lesão hepática aguda em camundongos;
- Avaliar a capacidade do OPB na prevenção dos danos celulares por meio da quantificação da lesão hepática.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Doenças Hepáticas

O fígado é um dos órgãos mais importantes do corpo, desempenha papel fundamental na regulação de diversos processos fisiológicos, como metabolismo, secreção e armazenamento. O fígado também é o principal responsável pela biotransformação de substâncias endógenas e/ou substâncias exógenas, bem como por sintetizar substâncias necessárias às funções orgânicas (LI et al., 2017; ROWE, 2017).

Além disso, as funções do fígado incluem a eliminação de drogas e toxinas da circulação, metabolismo de carboidratos e gorduras, síntese de proteínas, bem como catabolismo de imunoglobulina A e insulina, metabolismo de vários compostos nitrogenados, captação e conjunção de bilirrubina, ácidos graxos livres e ácidos biliares e armazenamento de vitaminas e minerais (LEE, 2003). Dada à complexidade e importância das funções do fígado, as doenças hepáticas continuam entre as principais ameaças à saúde pública e representam problema mundial, além de causarem impactos econômicos substanciais (BLACHER et al., 2013; RAMALINGAM et al., 2018).

As células presentes no fígado são chamadas de hepatócitos. Essas células conseguem proliferar ativamente, recebendo estímulos externos ou regulação de fatores humorais, o que contribui para o elevado poder de regeneração hepática. Lesões hepáticas são comuns pela própria função do órgão de filtrar toxinas tanto de origem bacteriana como de origem químicas, porém, no caso de lesões hepáticas crônicas, os hepatócitos perdem a capacidade normal de proliferação, contribuindo assim para o agravamento da lesão (DIVERS, 2015).

As doenças hepáticas podem ser categorizadas em hepatite viral, hepatite alcoólica ou não alcoólica, doenças hepáticas colestáticas, colangiopatias e doenças autoimunes, que podem em muitos casos evoluir para cirrose, carcinoma hepatocelular e colangiocarcinoma (SCHNABL & BRENNER 2014; ROWE, 2017).

A doença hepática refere-se a um quadro no qual se observa danos às células, tecidos, estrutura ou função do órgão, o fígado é vulnerável à lesão tóxica devido à sua localização estratégica e ao seu papel fundamental na

biotransformação dos medicamentos. Lesão, degeneração e necrose hepatocelulares resultam dos efeitos citotóxicos do medicamento sobre os componentes celulares (MATTOS, 2010) esse dano pode ser induzido por fatores biológicos (bactérias, vírus e parasitas), doenças autoimunes (hepatite imune, cirrose biliar primária), bem como pela ação de diferentes substâncias químicas, como por exemplo, elevadas doses de paracetamol, fármacos empregados no tratamento da tuberculose, compostos tóxicos (tetracloreto de carbono (CCl_4)), tioacetamida, dimetilnitrosamina, D-galactosamina/LPS e inquestionavelmente, o consumo excessivo de álcool (MADRIGAL-SANTILLÁN et al., 2014). A lesão hepática induzida por medicamentos é considerada a principal causa de insuficiência hepática aguda e morte em indivíduos com quadro de hepatite medicamentosa (LEE, 2003).

3.1.1 Doença hepática aguda em animais

As doenças hepáticas agudas podem ter variadas causas, incluindo infecções virais, distúrbios autoimunes, intoxicações e dietas desequilibradas (FONTANA 2014; NEVZOROVA et al., 2020). Dentro das doenças hepáticas não alcoólicas, as agudas em particular, são definidas como lesões que ocorrem no tecido hepático normalmente devido a altas doses de drogas como paracetamol ou envenenamento (ROBLEDO, 2015).

Em animais, esses casos ocorrem mais comumente devido a altas doses de fármacos, que fazem com que o fígado perca repentinamente sua função de desintoxicação. Em cães, normalmente a ingestão de certos tipos de plantas, algas ou fungos são responsáveis pela intoxicação por certas toxinas e pelo desenvolvimento de lesões hepáticas. Alguns exemplos são a ingestão de *Cycad Palms* (sagu-de-jardim) (FERGUSON et al., 2011), *Microcystis aeruginosa* (*cyanobacteria*) (DEVRIES et al., 2001), *Amanita phalloides* (cicuta verde) (KANTOLA et al., 2009) aflatoxinas devido à contaminação em rações comerciais para cães (DERESZYNSKI et al., 2008) e até mesmo o xilitol, um substituto do açúcar encontrado em produtos alimentícios humanos que normalmente causa hipoglicemia em cães (DUNAYER, 2006). Os sintomas das lesões hepáticas agudas podem variar de acordo com o tipo de toxina que a causa, mas em geral os mais comuns são os sintomas neurológicos que incluem

tremores e convulsões, assim como vômitos, diarreia, hipoglicemia e dor abdominal (DEVRIES et al., 2001; FERGUSON et al., 2011; MILEWSKI & KHAN, 2006; PUSCHNER et al., 2007).

O desenvolvimento de doenças hepáticas agudas também é relativamente comum em animais de grande porte, como cavalos e potros, devido ao envenenamento pela pastagem *Panicum coloratum* (CORNICK et al., 1998; JOHNSON et al., 2006), por plantas que contenham a substância química alcalóide de pirrolizidina como *Ageratum conyzoides* (erva de São João); *Emilia sonchifolia* (flor pincel); *Heliotropium indicum* (cravo de urubu) (CURRAN et al., 1996; LAST–MMEDVET, 2021; RÜCKERT et al., 2019), em situações mais raras podem acontecer quadros de insuficiência hepática aguda causada pela doença de Theiler (RAMSAUER et al., 2021; ELLERO et al., 2021; GARCÍA et al., 2022) entre outras.

Em ruminantes a hepatite ocorre comumente devido à intoxicação por alcaloides pirrolizídicos (WACHENHEIM et al., 1992; WIEDENFELD & EDGAR, 2011) e outras plantas com compostos tóxicos como a *Pteridium esculentum* (samambaia do campo), *Cestrum nocturnum* (dama-da-noite), *Senecio brasiliensis* (Maria mole); *Pteridium aquilinum* (Samambaia); *Palicourea marcgravii* (Cafezinho) entre outras, além da ingestão de certos minerais (cobre, ferro, zinco) (ENSLEY, 2020; OTT et al., 1966) ou deficiência (cobalto) (GONZÁLEZ-MONTAÑA et al., 2020; MILLS, 1981). Além disso, a ingestão de substâncias tóxicas por meio da ingestão de plantas ou algumas algas também pode estar relacionada à hepatite aguda (CLAYTON et al., 2020; WITTE et al., 1990).

Em camelídeos como lhamas e alpacas, as causas mais comuns de desenvolvimento de doença hepática agudas são as infecções bacterianas como colangiohepatite bacteriana causada por *Salmonella spp*, *Escherichia coli*, *Listeria spp*, *Clostridium spp* (BJÖRKLUND et al., 2019) e podem ocorrer também devido a infestações por parasitas hepáticos (ALSTEDT et al., 2022).

O diagnóstico das doenças hepáticas pode ser feito por meio de exames de sangue, porém, a avaliação da concentração de enzimas hepáticas não costuma ser um parâmetro para delimitar uma doença aguda de uma doença crônica, em muitos casos, animais com altos graus de disfunção hepática crônica

podem apresentar valores normais de enzimas hepáticas no sangue, diferente dos casos agudos (MARYCZ et al., 2019).

A doença aguda pode ser detectada pela análise de sangue, onde são medidos os níveis de bilirrubina, a concentração sérica de enzimas hepáticas e o tempo de protrombina que mede a capacidade de coagulação do sangue (CORNELIUS, 2020; KALUGNIY et al., 2021; SATUÉ et al., 2022). Os tratamentos em animais dependem da sua causa, podem ser utilizados desde a administração de carvão ativado que reduz a absorção de drogas no trato gastrointestinal (TOLEDO-PEREYRA, 1985) ou tratamento com N-acetilcisteína utilizada para casos de altas doses de paracetamol e outras toxinas (AKAKPO et al., 2021). Na grande maioria medicamentos comerciais a com efeitos antitóxicos e hepatoprotetores são utilizados com frequência (RADOSTITS et al., 2002). Caso a lesão hepática aguda seja de origem desconhecida, é necessária uma biópsia para analisar o tecido hepático e determinar o agente causador da lesão (JERICÓ, 2015).

O manejo clínico das doenças hepáticas ainda é um grande desafio devido ao diagnóstico tardio, serem de natureza progressiva, limitações na compreensão de sua patogênese e também devido à disponibilidade limitada de estratégias terapêuticas (LI et al., 2017; LLOVET et al., 2021). Estudos demonstram que as doenças hepáticas estão associadas ao estresse oxidativo, respostas inflamatórias exacerbadas e comprometimento da homeostase metabolismo energético, que podem induzir dano e morte celular (LI et al., 2017, LLOVET et al., 2021).

Apesar dos expressivos avanços na medicina moderna, ainda não há fármacos completamente eficazes capazes de estimular a função do fígado, oferecer proteção completa ao órgão ou auxiliar na regeneração de células hepáticas (GIORDANO et al., 2014). Diante desse cenário, a identificação de novas substâncias ou estratégias para o tratamento das doenças hepáticas é imperativa, nesse contexto, o uso de compostos de origem vegetal desempenha papel fundamental na assistência médica.

3.1.2 Lesão hepática induzida por drogas (DILI)

A lesão hepática induzida por medicamentos, também conhecida como hepatite medicamentosa, ou DILI (Drug Induced Liver Injury), é uma doença comum do fígado que vem manifestar-se geralmente entre um e noventa dias após a administração do medicamento, o quadro clínico da doença é variável, e pode ocorrer desde a transitória alteração das enzimas hepáticas até a insuficiência hepática fulminante, levando ao óbito (TAJIRI & SHIMIZU, 2008).

Muitos medicamentos empregados rotineiramente na clínica médica podem provocar como reação colateral indesejável, a agressão ao fígado, limitando seu uso e os benefícios esperados (GU & MANAUTOU, 2012).

A lesão hepatocelular após a ingestão de drogas é o evento crítico subjacente à DILI (STURGILL & LAMBERT, 1997). As principais vias de sinalização que medeiam a DILI têm sido difíceis de estudar em pacientes, devido à rápida progressão da doença no momento do diagnóstico. Consequentemente, a maior parte do conhecimento mecanicista da DILI são provenientes de estudos com cultura celular e estudos em animais usando paracetamol, por ser um dos poucos medicamentos aprovados que causam lesão hepática em animais (KAPLOWITZ, 2005; HAN et al., 2010 e 2013; CHEN et al., 2015).

Nos EUA e na China as lesões hepáticas decorrentes da DILI são responsáveis por cerca de 11 a 14% dos casos de falência hepática aguda, normalmente esses casos são atribuídos ao uso indiscriminado de antibióticos, medicamentos e suplementos dietéticos, agentes cardiovasculares e fármacos antidepressivos (CHALASANI et al., 2015; GANGER et al., 2018; SHEN et al., 2019). Na França e na Islândia, a DILI ocorre com uma incidência anual de cerca de 14-19 por 100.000 habitantes (BJÖRNSSON et al., 2013; SGRO et al., 2002). Em um estudo realizado no Brasil, a maioria dos casos de insuficiência hepática aguda foi ligada à etiologia indeterminada, à DILI e à hepatite autoimune. A DILI, por sua vez, foi a causa mais comum de falência hepática aguda em alguns estados do Brasil, especialmente nas regiões Sul e Sudeste (SANTOS et al., 2021). Segundo o sistema nacional de informações tóxico-farmacológicas, a intoxicação por medicamentos representa quase 30% de todos os casos de intoxicação humana e animal (SINTOX, 2020), tabela 1.

Tabela 1: Casos registrados de intoxicação humana e de intoxicação animal e de solicitação de informação por agente tóxico no Brasil.

Agente	Vitima	Humana	Animal	Informação	Total	
		nº	nº	nº	nº	%
Medicamentos		20637	134	631	21402	26,79
Agrotóxicos/Uso Agrícola		2548	64	94	2706	3,39
Agrotóxicos/Uso Doméstico		831	66	74	971	1,22
Produtos Veterinários		709	111	51	871	1,09
Raticidas		1151	84	47	1282	1,60
Domissanitários		4652	34	75	4761	5,96
Cosméticos		1067	4	24	1095	1,37
Produtos Químicos Industriais		2878	45	69	2992	3,75
Metais		55	1	10	66	0,08
Drogas de Abuso		2743	7	27	2777	3,48
Plantas		821	71	58	950	1,19
Alimentos		472	3	16	491	0,61
Animais Peç./Serpentes		3070	47	173	3290	4,12
Animais Peç./Aranhas		5956	18	246	6220	7,79
Animais Peç./Escorpiões		11679	6	258	11943	14,95
Outros Animais Peç./Venenosos		6130	21	288	6439	8,06
Animais não Peçonhentos		5050	22	330	5402	6,76
Desconhecido		1004	54	63	1121	1,40
Outro		4662	54	385	5101	6,39
Total		76115	846	2919	79880	100
%		95,29	1,06	3,65	100	

Fonte: Adaptado de SINTOX, 2020.

A hepatotoxicidade medicamentosa tem recebido grande atenção nos últimos anos e ocorre devido ao uso indiscriminado de medicamentos, principalmente aqueles de venda livre (WILLIAMS et al., 2002).

Os metabólitos de certos fármacos podem lesar diretamente o fígado ou induzirem reações imunes potencialmente lesivas (imunomediadas), além disso, algumas medicações levam à morte celular pois interferem na sua função mitocondrial, reduzindo sua oxidação de gordura e/ou produção energética, a necrose ou apoptose celular causadas pela abertura do poro de transição de permeabilidade da mitocôndria representa outra fonte de dano envolvido na patogênese dessa doença (ANDRADE et al., 2008). A hepatotoxicidade causada por fármacos pode ocorrer de duas formas: direta através de metabólitos ou radicais livres que causam peroxidação lipídica na membrana, com os sintomas surgindo em um curto período; e a idiossincrática, geralmente associada a

reações autoimunes e não dependendo da dose administrada, ocorre de forma inesperada com sintomas que surgem após um maior período de tempo (BLATT et al., 2016).

Com isto, essa patologia pode variar de quadros assintomáticos, muitas vezes autolimitados, com alterações apenas nos testes laboratoriais, até quadros mais graves de insuficiência hepática aguda, e raramente, desenvolver doença hepática crônica (DEVARBHAVI, 2012). A principal forma clínica é semelhante a uma hepatite viral aguda, devido a lesão dos hepatócitos que culmina em falha funcional e icterícia, levando a quadros de mal-estar, anorexia, náuseas e dor abdominal (ANDRADE et al., 2008).

Deve-se considerar que é possível a ocorrência de DILI em indivíduos com doença de fígado pré-existente, como uma patologia sobreposta, além disso, doenças concomitantes como infecção pelo vírus da imunodeficiência humana, alcoolismo, diabetes e obesidade devem ser valorizadas, pois podem comprometer negativamente a evolução (DEVARBHAVI, 2012).

A notificação da DILI é relativamente baixa, razão pela qual os mecanismos de toxicidade hepática de alguns medicamentos ainda são desconhecidos. O motivo da subnotificação pode estar relacionado à dificuldade de identificação e diagnóstico, visto que este depende de um elevado grau de suspeita por parte dos profissionais de saúde e ampla investigação de outros diagnósticos diferenciais (TESCHKE & ANDRADE, 2016; DANAN & TESCHKE, 2019).

3.1.3 Lesão hepática induzida por acetaminofeno (paracetamol)

O acetaminofeno, também conhecido como paracetamol, derivado do paminofenol, é o metabolito ativo da fenacetina, responsável pelo efeito analgésico do composto (JUNIOR et al., 2013). A molécula do paracetamol apresenta um fenol caracterizado pelo grupamento hidroxila ligado a um benzeno e uma amida caracterizada pelo nitrogênio derivado do grupamento NH₃ ligado a um radical de acila (figura 1) (SHINODA et al., 2010). Esse composto pertence à classe dos analgésicos e antipiréticos, tendo uma ação analgésica e alta ação antipirética, tem o mecanismo de ação que inibe a cicloxigenase 2 (COX-2), e possui menos efeitos adversos sobre o trato

gastrointestinal (LOPES & MATHEUS, 2012). É indicado para alívio de dores leve à moderada, como cefaleia e mialgia (KATZUNG, 2010).

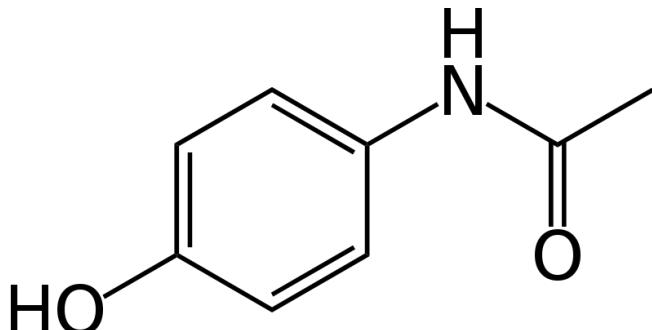


Figura 1: Estrutura do paracetamol formada por um grupo grupamento hidroxila ligado a um benzeno e uma amida ligado a um radical acila (SHINODA et al., 2010).

O paracetamol é um fármaco relativamente seguro quando usado de forma consciente segundo as doses terapêutica. Entretanto, seu uso generalizado e sem orientação adequada pode levar o usuário desenvolver sérios problemas de saúde, como quadros de intoxicação e dano hepático (LOPES et al., 2012). Os primeiros relatos de hepatotoxicidade por paracetamol em seres humanos surgiram na literatura na década de 1960, desde então, as altas dosagens estão entre a causa mais comum de insuficiência hepática aguda na maioria dos países ocidentais (MCGILL et al., 2012).

O paracetamol é um medicamento de fácil acesso e o desconhecimento da população sobre seus efeitos nocivos ao organismo têm aumentado significativamente o número de intoxicações por esse fármaco, podendo causar a princípio sintomas como náuseas, cefaleia, vômitos, sudorese intensa e icterícia (ROWDEN et al., 2005). O uso prolongado de paracetamol pode acometer o fígado com insuficiência hepática aguda e os rins com insuficiência renal, levando até ao óbito, segundo alguns estudos, a insuficiência hepática aguda é causada, em 50% dos casos, pela hepatotoxicidade proveniente de fármacos, incluindo o paracetamol (MEIRA et al., 2013). Na administração de doses tóxicas, as vias tradicionais de metabolização saturam e a via do Citocromo P-450 assume a biotransformação do paracetamol, ocasionando

maior formação de metabólito tóxico e radicais livres, conduzindo a necrose dos hepatócitos (HEUBI, 1998).

Em humanos, o quadro clínico de intoxicação por paracetamol apresenta geralmente três períodos bem definidos. Nas primeiras 24 horas, o paciente se apresenta assintomático ou com leve mal-estar, vômitos, náuseas, palidez e epigastralgia (MCGILL & JAESCHKE, 2013). Entre 24 e 72 horas, o paciente pode seguir assintomático ou apresentar sintomatologia leve, semelhante ao primeiro período e, ou com dor no hipocôndrio direito. A alteração característica é o aumento nos níveis sorológicos de alanina aminotransferase (ALT) e aspartato transaminase (AST), hiperbilirrubinemia e alguns pacientes podem desenvolver nefrotoxicidade, além da hepatotoxicidade (HINSON et al., 2010; YOON et al., 2016). O período de 72 horas a cinco dias é de máxima expressão da hepatotoxicidade, podendo evoluir para falência hepática aguda (SEBBEN et al. 2010). As intoxicações causadas por doses elevadas (acima de 4g/dia) de paracetamol podem ocasionar também distúrbios cardiovasculares, neurológicos, gastrointestinais e endócrinos (SEBBEN et al., 2010).

A hepatotoxicidade também pode ser observada em roedores. Os ratos demonstram certa resistência, ao contrário de camundongos e hamsters que são modelos experimentais extremamente sensíveis. Histologicamente, pode ser observada a perda de glicogênio e a vacuolização de hepatócitos centrolobulares nas primeiras 2 horas, modificações nucleares e células picnóticas na região centrolobular em 3 horas e vasta necrose na mesma região em 6 horas. Sabe-se que, nesse modelo, as células morrem majoritariamente por necrose. O número de células com características morfológicas que determinam a apoptose é inferior a 1% em todo o parênquima e os níveis de caspase 3 não se encontram aumentados em fígado de camundongos intoxicados com APAP (MALHI et al., 2006; KON et al., 2007).

Modelos experimentais que utilizam intoxicação por paracetamol têm sido amplamente utilizados para avaliar hepatoproteção de drogas e compostos vegetais (LITOVIDZ, 2000).

3.2 Produtos de origem vegetal na prevenção e tratamento da doença hepática

Produtos de origem vegetal têm sido amplamente utilizados em todo o mundo na alimentação e na terapia. O consumo de plantas medicinais e alimentos funcionais vêm sendo aceito como alternativa aos fármacos convencionais, tanto em países desenvolvidos como em desenvolvimento (OLIVEIRA et al., 2011). Devido à diversidade de plantas e seus efeitos biológicos no organismo humano, essas são potenciais alvos de estudos de novas moléculas ativas. Isso ocorre, principalmente, com as plantas superiores, as quais têm sido fontes de novos compostos com atividades farmacológicas (REYES-GARCÍA, 2010).

Estima-se que aproximadamente 80% da população mundial empregue a medicina tradicional para cuidados de saúde, que se baseia predominantemente em materiais vegetais (YUNES et al., 2001). No Brasil, plantas medicinais vêm sendo avaliadas quanto a seus efeitos hepatoprotetores e antioxidantes (GAMBERINI et al., 1991; GONZÁLEZ et al., 1993; PANIZZA et al., 1998; SILVA et al., 2014). Entretanto, a quantidade de medicamentos que são utilizados no tratamento de doenças hepáticas e que apresentam resultados expressivos em seres humanos e animais ainda não é suficiente para manter o mercado (MURIEL & RIVERA-ESPINOZA, 2008).

Plantas com potencial na prevenção ou tratamento das lesões hepáticas têm sido descritas, em particular aquelas com propriedades antioxidantes (LI et al., 2019). Muitas dessas espécies contêm em sua composição fitoquímica compostos como fenóis, cumarinas, ligninas, óleos essenciais, monoterpenos, glicosídeos, alcaloides, carotenoides, flavonoides, ácidos orgânicos e xantinas. Foi demonstrado que o extrato *Caryocar brasiliense* Cambess. (pequi), que além das propriedades anti-inflamatórias, cicatrizante e analgésicas (SARAIVA et al., 2011), o pré-tratamento de animais submetidos a lesão hepática com tetracloreto de carbono (CCL_4) foi capaz de reduzir os níveis séricos de alanina aminotransferase (ALT) e de aspartato aminotransferase (AST) além de limitar os danos hepáticos devido a sua ação anti-inflamatória e antioxidante (TÔRRES et al., 2016). Essas ações parecem estar associadas ao seu conteúdo de ômega em média 9 ácidos graxos monoinsaturados e outros componentes fitoquímicos (DE OLIVEIRA et al., 2010).

Também foi descrito que a *Cynara scolymus* L. (alcachofra) exerce efeito hepatoprotetor e anti-apoptótico, associado à redução do estresse oxidativo

quando testado em ratos induzidos a lesão hepática por paracetamol, (HEIDARIAN & RAFIEIAN-KOPAEI, 2013). Enquanto os efeitos hepatoprotetores da *Silybum marianum* (cardo mariano) e *Curcuma longa* (cúrcuma) parecem estar associados à ação anti-inflamatória dessas espécies (LEE et al., 2010; WU et al., 2010; MILAGRES et al., 2020; FREITAS et al., 2015). Estes dados corroboram com o potencial de produtos de origem vegetal na prevenção e tratamento das doenças hepáticas agudas e crônicas (MILAGRES et al., 2020).

3.2.1 *Acrocomia aculeata* (Jacq) (Bocaiuva)

A região Centro-Oeste é caracterizada majoritariamente pela vegetação de cerrado, considerada a segunda maior formação vegetal brasileira, com vasta biodiversidade, compreendendo cerca de 10 mil espécies vegetais (RUSSELL, 2004). Muitas das espécies nativas têm potencial alimentar, madeireiro, agroindustrial, forrageiro e medicinal. Dentre a riqueza vegetal, as palmáceas oleaginosas despertam interesse no setor produtivo (AQUINO et al., 2004). A espécie *A. aculeata* pertence à família Arecaceae, e é genericamente conhecida como palmeira, apresentando grande distribuição geográfica, povoando desde o sul do México até o sul do Brasil, Paraguai e Argentina (LORENZI & MATOS, 2006). A bocaiuva é considerada uma das espécies de palmáceas que mais se destaca no Brasil, cresce naturalmente em grandes populações, tanto em áreas degradadas ou conservadas, sendo bem adaptada a diferentes ecossistemas (MOTTA et al., 2002; RATTER et al., 2003).

O tronco possui diâmetro em média de 20 a 30 centímetros, com a presença de nós e espinhos pretos afiados com cerca de 10 centímetros de comprimento (Figura 12). As raízes podem ser subterrâneas ou aéreas (Miranda et al., 2001; Lorenzi, 2006). O estipe pode ser coberto pelas bases dos pecíolos, que permanecem aderidas a este por muitos anos. São solitários ou cespitosos e raramente escandentes, aéreos ou subterrâneos. Quando aéreo, pode apresentar-se liso ou densamente coberto por espinhos. As folhas são verde-escuro de forma palmada, pinadas e inteiras, com bainhas abertas ou fechadas e pecíolos curtos ou longos.

Geralmente consiste entre 20 e 30 folhas no topo, com comprimento

variando de 4 a 5 metros e apresentando aproximadamente 130 folíolos de cada lado e espinhos na região central (MISSOURI, 2005; FRUITS, 2005; LORENZI, 2006).



Figura 2: Palmeiras de *A. aculeata*. **Fonte:** arquivo pessoal.

No Brasil, estende-se desde os estados de São Paulo e do Rio de Janeiro, passando por Minas Gerais e por todo o Centro-Oeste, Nordeste e Norte, é considerada a mais frequente espécie de palmeira de porte arbóreo em áreas de pastagens (LORENZI & MATOS, 2006). A bocaiuva é um exemplo de planta oleaginosa típica de áreas de cerrado com grande potencial de aplicação no setor industrial. Atualmente, a *A. aculeata* é amplamente utilizada como fonte de alimento, porém, suas propriedades terapêuticas ainda são pouco conhecidas (LORENZI & MATOS, 2006).

No cenário brasileiro, existem perspectivas de que a bocaiuva se torne a palmeira oleaginosa mais importante comercialmente, com valor econômico relevante, dada a possibilidade de seus frutos fornecerem 5 % de farinha

comestível, 35 % de tortas forrageiras, 35 % de combustível de grande poder calórico, e a expectativa de transformar de 30 a 50% do peso da castanha em óleo (SILVA et al., 2019). Foi demonstrado que em condições favoráveis, uma planta pode produzir de 3 a 6 cachos de frutos, pesando de 10 a 12 kg cada cacho com aproximadamente 400 a 500 frutos por cacho, representando 4000 a 5000 kg de óleo/ hectare, superando em 10 vezes o rendimento do óleo de soja (NUCCI, 2007; CHUBA et al., 2008; RAMOS et al., 2008).

Vale ressaltar que além do óleo, os frutos tem aproveitamento total (casca, polpa, castanha e amêndoas) e a porção comestível composta pela polpa e amêndoas mostram bom rendimento nas preparações culinárias e possuem mercado potencial, inclusive para outros estados brasileiros (RAMOS et al., 2008; SALAS-SALVADÓ et al., 2008).

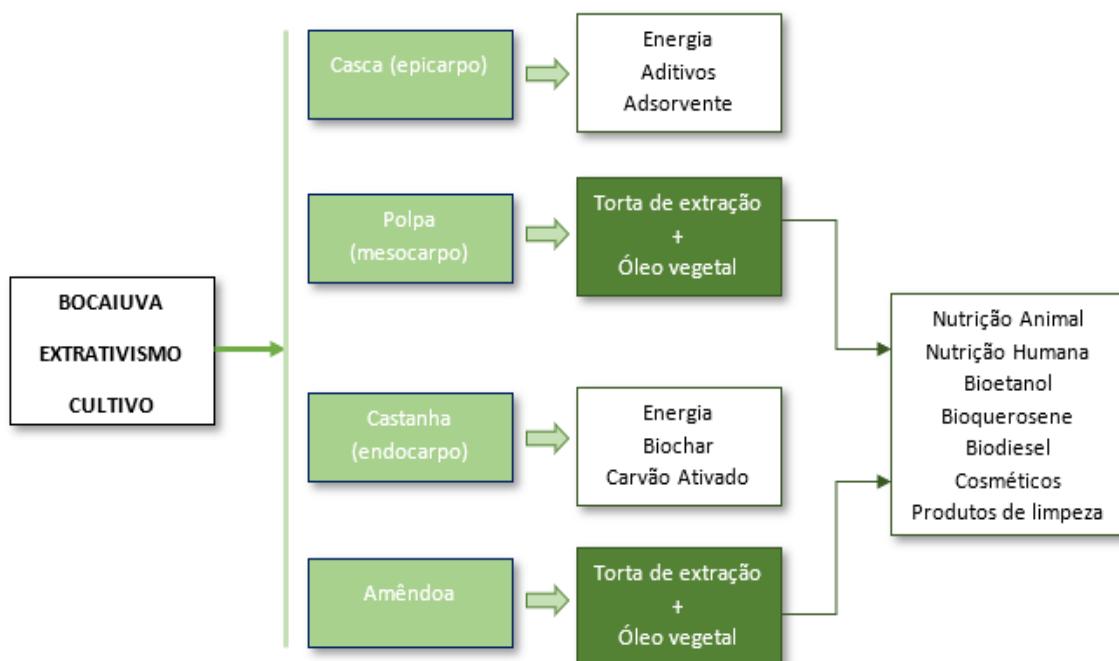


Figura 3: Partes da bocaiuva e suas aplicações. **Fonte:** Portal macaúba, 2018.

Associado a alta produtividade, a bocaiuva é rica em constituintes químicos na sua polpa e amêndoas, a qualidade nutricional da polpa da bocaiuva, é cerca de 1,7% de minerais totais, 17% de lipídeos, 2% de proteínas, 22,8% de carboidratos totais, 13,76% de fibra e valor energético estimado em 167,67 Kcal/100g de polpa úmida (RAMOS et al., 2008). As amêndoas apresentam alto teor lipídico, (51,7%), proteínas em torno de 17,6% e fibras 15,8% (HIANE et al.,

2006). Também são encontrados nos frutos quantidade expressiva de carotenoides, como o β -caroteno, além de altos teores de tocoferóis (RAMOS et al., 2008; COIMBRA & JORGE 2011), além de ser rica em cobre, zinco e potássio (RAMOS et al., 2008).



Figura 4: Estruturas do fruto da bocaiuva. **Fonte:** adaptada de Hilst, 2015.

A bocaiuva pode fornecer dois tipos de óleos, o da polpa que é mais aproveitado na indústria de cosméticos e como biodiesel e o da amêndoas, considerado mais nobre e destinado a culinária (ARISTONE & LEME 2006). O óleo produzido pela polpa é de grande interesse para as indústrias brasileiras por produzir óleo vegetal de alta qualidade, sendo comparado ao óleo de oliva. (HIANE et al., 2005; PENHA, et al., 2015).

3.2.2 Óleo da polpa de bocaiuva

A polpa da bocaiuva na forma natural é consumida pela população local ou nas preparações da culinária regional, tais como sorvetes, bolos, podendo enriquecer a dieta como fonte complementar de nutrientes essenciais, a polpa mostrou-se rica em lipídeos totais, carboidratos e fibras (RAMOS et al., 2008).

O OPB tem características favoráveis para a indústria de alimentos e para a produção de biodiesel, devido ao perfil de ácidos graxos ser composto majoritariamente do ácido oleico (NUNES et al., 2015). Uma importante alternativa é a revitalização do uso do óleo de macaúba como óleo de cozinha dado sua similaridade com o azeite de oliva (RAMOS et al., 2008).

O perfil de ácidos graxos do OPB é composto por em média doze ácidos graxos, a maioria ácidos graxos insaturados, sendo o ácido oleico o mais abundante (72%), seguido por 16% de ácido palmítico (LESCANO et al., 2015; TILAHUN et al., 2019; COSTA et al., 2020). A composição do OPB é comparável ao azeite de oliva (NISSENSOHN et al., 2016), e o consumo dessa fonte de óleo pode estar associado à redução de fatores de risco para doença coronariana, em especial, melhora do perfil lipídico, inibição da oxidação de lipídios e DNA, diminuição da resistência à insulina e inflamação (ESTRUCH et al., 2006; GILLINGHAM et al., 2011; CALDER, 2017).

Alguns estudos já demonstraram que o OPB é provido de importante atividade anti-inflamatória, sendo capaz de inibir a migração de leucócitos para o foco inflamatório e que essa ação possivelmente é mediada por compostos fenólicos e ácidos graxos, que são capazes de reduzir mediadores inflamatórios como citocinas e óxido nítrico (WIKTOROWSKA-OWCZAREK et al., 2015; VENTRO et al., 2017), bem como a produção de radicais livres por macrófagos (GUIDONI et al., 2019).

Além de seus efeitos anti-inflamatórios, foi demonstrado que o OPB possui efeito antigenotóxico, sendo capaz de prevenir a ocorrência de danos ao DNA (SILVA et al., 2019; COSTA et al., 2020), provavelmente decorrente da presença de ação antioxidante do OPB, visto que em estudos prévios realizados por nosso grupo e corroborado por outros pesquisadores, foi demonstrado que o OPB contém altas compostos antioxidantes como os carotenoides (SANJINEZ-ARGANDOÑA & CHUBA 2011; COSTA et al., 2020), α-tocoferol (COIMBRA & JORGE 2011; SCHEX et al., 2018). Estudos mostraram que o β-caroteno é capaz de suprimir a liberação de citocinas como a IL-1 β , IL-6 e TNF-α pela inibição das vias de sinalização NF-κB, JAK2/STAT3 e JNK/p38 MAPK em macrófagos (LI et al., 2019). Em relação à mutagênese, foi demonstrado que a suplementação com α-tocoferol e β-caroteno pode proteger o DNA contra danos oxidativos, apoiando a hipótese de que óleos vegetais, ricos nestes antioxidantes, podem ter propriedades antimutagênicas (ANTER et al., 2010).

Também foi demonstrado que o OPB é capaz de reduzir o peso, acúmulo de gordura no tecido adiposo e níveis séricos de glicose em ratos no modelo de diabetes tipo 2 (NUNES et al., 2018), sugerindo que o consumo desta fonte de óleo pode estar associado à redução de fatores de risco para doença

coronariana, melhora do perfil lipídico, inibição da oxidação de lipídios e DNA, diminuição da resistência à insulina e inflamação (ESTRUCH et al., 2006; GILLINGHAM et al., 2011; CALDER, 2017).

Visto que as doenças hepáticas estão associadas ao estresse oxidativo, respostas inflamatórias exacerbadas e comprometimento da homeostase metabolismo energético (LI et al., 2017; ROMUALDO et al., 2021), as propriedades farmacológicas do OPB já descritas sugerem que este possa representar um importante recurso para a prevenção e tratamento de lesões hepáticas. Assim, o presente projeto propõe avaliar o efeito de incorporação do OPB na dieta de camundongos submetidos a protocolos de lesão hepática aguda e crônica induzidos por xenobióticos.

O OPB apresenta potencial promissor como óleo vegetal inovador por seu baixo custo, propriedades farmacológicas diversas e propósitos nutricionais versáteis. Os resultados deste projeto poderão agregar valor à cadeia produtiva da bocaiuva no Mato Grosso do Sul, contribuir para o crescimento da bioeconomia local e estimular a criação de produtos inovadores voltados à segurança alimentar e à saúde humana e animal.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Obtenção dos frutos de *A. aculeata*

Os frutos maduros foram coletados na região norte da cidade de Campo Grande/MS, na fazenda estância Catijó, estado de Mato Grosso do Sul, nas coordenadas geográficas 22° 14' S e 54°55'W, com altitude média de 446 metros. As coletas foram realizadas entre os meses de outubro de 2021 e janeiro de 2022.

Os frutos utilizados para obtenção da polpa foram selecionados, desprezando aqueles que apresentavam injúrias, rachaduras e presença de fungos, e após a seleção foram devidamente acondicionados em sacos plásticos e congelados em freezer a -20°C. O peso da matéria prima total foi de 15,5kg.



Figura 5: Obtenção dos frutos de bocaiuva; a- Palmeiras utilizadas para colheita do fruto de bocaiuva; b- seleção dos frutos, seta representa fruto ideal.

4.2 Obtenção do óleo da polpa da bocaiuva (OPB)

Os frutos selecionados e congelados foram descongelados a temperatura ambiente e logo após despolpados manualmente com o auxílio de faca sobre

uma bancada higienizada, separando a casca, polpa, amêndoas e endocarpo, após isso o material foi pesado aonde obtivemos o rendimento de 4kg de polpa, esta foi acondicionada em embalagens de plástico e armazenadas em freezer a -20°C. As amostras foram mantidas congeladas até o momento da secagem.

Para a secagem as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente e em seguida levadas à estufa com circulação de ar a aproximadamente 60 °C por 24 horas. As amostras secas foram trituradas em um liquidificador industrial (Vitalex, modelo EV402) na velocidade de 12000 RPM e novamente foram congeladas até o momento da extração.



Figura 6: Obtenção da polpa de bocaiuva; a- despolpamento manual do fruto de bocaiuva; b- secagem da polpa em estufa.

A extração do óleo da polpa foi realizada utilizando como solvente o hexano e como equipamento, o Soxhlet, que se trata de um extrator de refluxo de solvente, cuja extração é intermitente, evitando a alta temperatura de ebulição do solvente e por consequência evita também sua decomposição (CECCHI, 2003). Os cartuchos de papel de filtro preenchidos com a amostra triturada foram confeccionados de forma a serem incorporados aos reboilers do aparelho extrator. Adicionou-se em média 500 ml de hexano nos reboilers, acoplou os condensadores aos mesmos, ligou-se a água de refrigeração e o aquecimento, dando início ao processo de extração com controle de tempo e temperatura, no qual se deu em torno de 6-8 horas em aproximadamente 75°C para cada

amostra.

O solvente foi removido em rotoevaporador a 40°C, conforme descrito por Costa e colaboradores (2012).

Após a separação, o óleo foi armazenado em vidro âmbar de 500 mL, recoberto com papel alumínio para evitar possíveis oxidações e mantido resfriado em geladeira a aproximadamente 10 °C até o momento das análises qualitativas e quantitativas, a quantidade total de OPB obtido foi de 1,5 litros.

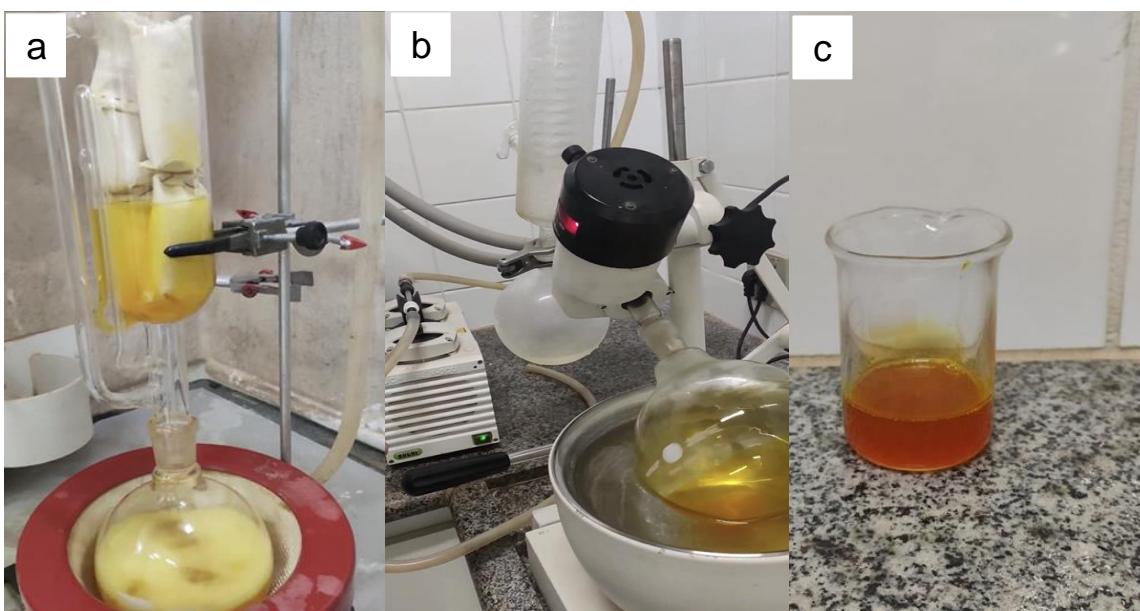


Figura 7: Obtenção do óleo da polpa de bocaiuva; a- extração do óleo realizada pelo Soxhlet; b- remoção do solvente pelo rotoevaporador; c- óleo bruto da polpa de bocaiuva.

4.3 Caracterização físico-química do OPB

Para a caracterização e avaliação de qualidade do OPB foi realizada a metodologia oficial da AOCS (*American Oil Chemists' Society*) que incluiu os índices de acidez, peróxido e iodo (AOCS, 2004). Para este estudo foram analisados os testes de qualidade através do índice de acidez e peróxido e identidade através do índice de iodo.

4.3.1 Índices de acidez

O índice de acidez é definido como o número de miligramas de hidróxido de potássio necessários para neutralizar os ácidos graxos livres de um grama de amostra. Revela o estado de conservação do óleo. A decomposição dos glicerídeos é acelerada pelo aquecimento e pela luz e a rancidez é quase sempre acompanhada de ácido graxo livre.

O índice de acidez foi determinado pela metodologia que utiliza como solução titulante, o hidróxido de sódio 0,1N e fenolftaleína como indicador de acordo com a técnica do Instituto Adolfo Lutz segundo WALKYRIA et al., 1976 e *Association of Official Analytical Chemists* (AOAC), (1990) e o resultado foi expresso em % de ácido oleico (m/m).

Objetivo: Definir e padronizar o procedimento para a determinação do índice de acidez através da conversão da porcentagem do ácido oleico (ácido graxo livre) existente na amostra em “mg de KOH” necessário para neutralizar 1(um) grama da amostra (MAPA, 2012).

Materiais: Frasco de Erlenmeyer de 125 ml, proveta de 50 mL, bureta de 25mL.

Reagentes: solução de éter álcool (2+1) neutra, solução alcoólica de fenolftaleína a 1% e solução de hidróxido de potássio 0,1N.

Procedimentos: Pesar 0,4 gramas de amostra em um frasco Erlenmeyer de 125ml, adicionar 5ml de solução éter/álcool (2+1). Agitar. Adicionar duas gotas de indicador fenolftaleína. Titular com solução de hidróxido de potássio 0,1N até a coloração rósea.

índice de acidez = $v \times f \times 5,61 / p$, dado em mg KOH/g

Acidez em ácido oleico por cento p/p = $(vg - vb) \times f \times N \times 28,2 / p$

v = nº de ml de solução de hidróxido de potássio 0,1N gasto na titulação.

vg = nº de ml de solução de hidróxido de potássio gasto na titulação da amostra.

vb = nº de ml de solução de hidróxido de potássio gasto na titulação do branco.

f = fator da solução de hidróxido de potássio.

N = normalidade do KOH

p = nº de gramas da amostra.

5,61 e 28,2 são relativos ao peso molecular do KOH e ácido oleico respectivamente.

4.3.2 Índices de peróxido

O índice de peróxido indica o grau de oxidação do óleo. Não constitui um índice infalível das características de conservação, porém indica até que ponto a oxidação progrediu. Geralmente é elevado quando a coloração da reação de Kreis (método colorimétrico que se baseia na reação, em meio ácido, do floroglucinol com epoxialdeídos ou os seus acetais) é intensa (coloração vermelha). É a medida do oxigênio reativo, em termos de miliequivalentes de oxigênio por 1000 gramas de amostra. São todas as substâncias que oxidam o iodeto de potássio e são consideradas como sendo peróxidos ou produtos similares provenientes da oxidação de gorduras. O índice de peróxidos foi determinado, segundo a AOAC (1990), pela capacidade da amostra em oxidar iodeto de potássio, e os resultados foram expressos em miliequivalentes.

Objetivo: Determinar todas as substâncias que oxidam o Iodeto de Potássio (KI) sob as condições de teste. Estas substâncias são geralmente consideradas como peróxidos ou outros produtos similares da oxidação de gorduras (MAPA, 2012).

Materiais: frasco de Erlenmeyer de 125 ml com tampa esmerilhada, proveta de 50 ml, bureta de 20ml.

Reagentes: solução de ácido acético clorofórmio (3:2), solução saturada de iodeto de potássio (71,4286 g/ml de solução), solução de tiossulfato de sódio divalente 0.1N (24,819g/1000ml de solução) e solução de amido a 1% (fervida por 1 minuto).

Procedimentos: Pesar 5 gramas da amostra em frasco Erlenmeyer de 125ml. Adicionar 30ml de solução de ácido acético: clorofórmio (3:2), agitar o frasco até a dissolução da amostra. Adicionar 0,5ml de solução saturada de iodeto de potássio, deixar em repouso por exatamente 1 minuto. Adicionar 30ml de água destilada. Titular com solução de tiossulfato 0,01N, com agitação. Prosseguir com a titulação até que a coloração amarelada tenha quase desaparecido. Adicionar 0,5ml de solução de amido a 1%e prosseguir com a titulação até o ponto final, quando ocorre o desaparecimento da coloração azul. Preparar uma prova em branco nas mesmas condições.

Cálculo= índice de peróxido, em milequivalentes, por kg da amostra.

$$(A - B) \times N \times 1000 / p$$

A = nº de ml da solução de Tiosulfato 0,01N gasto na titulação da amostra

B = nº de ml da solução de Tiosulfato 0,01N gasto na titulação da prova em branco.

N = Normalidade real da solução de tiosulfato de sódio;

P = Peso da amostra, em gramas.

4.3.3 Índices de iodo

O índice do iodo é mensurado pelo grau de insaturação de um óleo ou de uma gordura. Na prática é determinado pela quantidade de halogênio absorvido e, convencionalmente, é expresso como peso de iodo absorvido por 100 gramas de amostra. O índice de iodo do óleo de polpa de bocaiuva foi determinado seguindo a técnica descrita pelas normas do Instituto Adolfo Lutz segundo WALKYRIA et al., 1976 e AOAC (1990), utilizando titulação com a solução de Wijs.

Materiais: vidro de relógio, provetas de 10 e 100ml, frasco Erlenmeyer de 500ml com boca esmerilhada, pipetas de 20 e 25 ml, bureta de 25ml.

Reagentes: solução de iodeto de potássio a 15%, solução de tiosulfato de sódio a 0,1N, solução de amido a 0,5%, tetracloreto de carbono, solução de Wijs.

Procedimentos: pesar 0,25g da amostra, em vidro de relógio, transferir cuidadosamente para um frasco Erlenmeyer de 500ml, usando 10ml de cloreto de carbono, com o auxílio de uma pipeta volumétrica. Adicionar com o auxílio de uma bureta, 20 ml da solução de Wijs. Agitar cuidadosamente por rotação. Deixar em repouso por 30 minutos, ao abrigo da luz e à temperatura de 25°C aproximadamente. Adicionar 10 ml da solução de iodeto de potássio a 15%, e 100ml de água recentemente fervida e fria. Titular com o tiosulfato de sódio 0,1N, adicionando-o lentamente e, com agitação constante, até observar uma fraca coloração amarela. Adicionar então de 1 a 2 ml da solução de amido e continuar a titulação até que a coloração azul desapareça. Colocar a rolha no frasco e agitar fortemente, neste final de titulação. Preparar uma determinação em branco, para cada grupo de amostras, realizando-a simultaneamente com as amostras.

Cálculo= $(B - A) f \times 1,27 / p$ = índice de iodo.

A = nº de ml da solução de Tiosulfato 0,01N gasto na titulação da amostra
B = nº de ml da solução de Tiosulfato 0,01N gasto na titulação da prova em branco.

f = fator da solução de tirosulfato de sódio 0,1N.

p = nº de g da amostra.



Figura 8: Análise das amostras; a- pesagem da amostra para caracterização; b- análise titulométrica das amostras.

4.4 Ensaios Biológicos com OPB

4.4.1 Animais

No total foram utilizados 21 camundongos isogênicos da linhagem C57 Black-6, machos, com oito semanas em média, pesando 18-22g, para separação dos grupos amostrais e ensaios biológicos. Os animais foram provenientes do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, mantidos em condições de temperatura (23-25°C) e o ciclo claro/escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Os experimentos foram conduzidos de acordo com as normativas do CONCEA e aprovados pela CEUA-UCDB Nº003/2022.

4.4.2 Divisão dos grupos amostrais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, grupo 1 animais grupo controle negativo contendo 5 animais, grupo 2 animais induzidos a lesão hepática aguda e pré-tratados com OPB contendo 8 animais e grupo 3 animais induzidos a lesão hepática aguda e não pré-tratados (tratados com salina) contendo 8 animais. Na figura 9 está disposta a representação esquemática da divisão dos grupos amostrais.

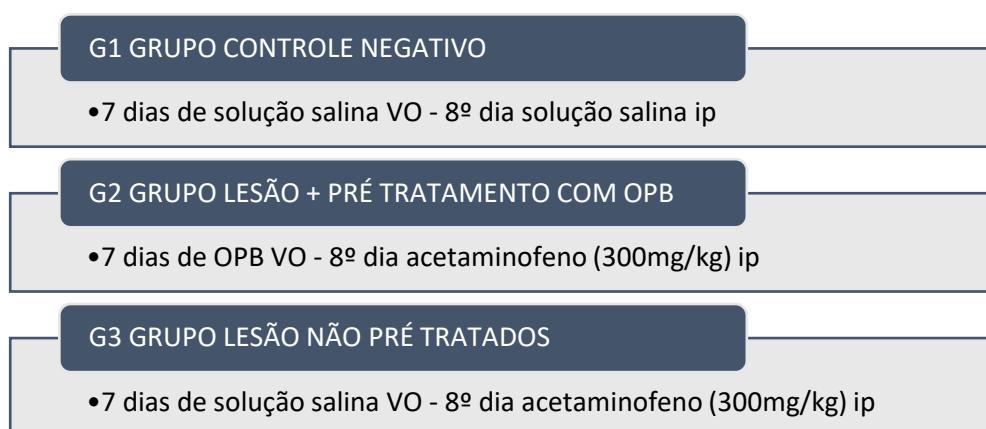


Figura 9: Representação esquemática da divisão dos grupos amostrais.

4.5 Indução da lesão hepática aguda

Foi utilizado no estudo o modelo de lesão hepática aguda induzida por acetaminofeno. Os camundongos foram submetidos a jejum alimentar e hídrico por 16 horas. Após isso os animais receberam intraperitonealmente (*i.p.*) o acetaminofeno 300 mg / kg ou veículo (PBS 1X). O acetaminofeno foi diluído em PBS 1X, aquecido a 60°C até completa solubilização e resfriado lentamente a 30-37°C para administração aos animais. O livre acesso à água e alimentos foi imediatamente restabelecido após os tratamentos. Após 24 horas os animais foram eutanasiados para coleta das amostras biológicas (SOUZA et al., 2021).

4.6 Delineamento Experimental

4.6.1 Avaliação do efeito do OPB na prevenção da lesão hepática aguda

Os 21 camundongos utilizados para esse ensaio receberam 50µL de OPB por gavagem por 7 dias consecutivos, respeitando o mesmo horário de aplicação. No 8º dia os camundongos foram submetidos ao protocolo de lesão hepática aguda e após 24 horas foram eutanasiados e as amostras biológicas coletadas para análise. Os animais controles receberam 50µL de solução salina no mesmo período e horário.

4.6.3 Coleta de amostras biológicas

As coletas das amostras biológicas foram realizadas 24 horas após as induções das lesões hepáticas agudas em seus respectivos grupos. Para isso os camundongos foram pesados e anestesiados com xilazina 7,5mg / Kg e cetamina 150 mg / Kg via intraperitoneal, a coleta de sangue foi realizada pelo método de punção cardíaca em seringa heparinizada. O sangue foi centrifugado por 10 min a 1500 RPM, e o soro reservado para posterior análise bioquímica. O fígado de cada animal foi retirado, pesado e fotografado, os fragmentos foram parte fixados em formalina tamponada com fosfato a 10% e parte congelados em nitrogênio líquido com armazenamento a -80 °C.

4.7 Determinação do impacto da prevenção com OPB sobre o peso dos animais

Para a determinação do peso, os camundongos foram pesados individualmente no primeiro e no oitavo dia do experimento, utilizando uma balança de precisão modelo Bel S2202H.

4.8 Determinação do impacto do OPB sobre o peso e dimensão do fígado de animais submetidos a lesão hepática induzida por acetaminofeno.

Após o término do período experimental e posterior coleta do material biológico, o fígado de cada animal foi colhido, pesado (peso fígado) e fotografado para análise macroscópica. O peso relativo do fígado foi calculado através da fórmula: "Peso relativo (%) = "Peso do fígado (g)" / Peso corpóreo (g)x100". Fragmentos de fígado foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. Outros fragmentos foram fixados em solução de

formol 10%, durante 24 horas, posteriormente trocados para álcool 96 % e processados histologicamente.

4.9 Análises séricas da alanina aminotransferase (ALT)

Para a realização das análises séricas foi utilizado o soro dos camundongos, realizou-se a dosagem de alanina aminotransferase (ALT), por método enzimático colorimétrico com o uso de kits comerciais (BioClin, Brasil) em um analisador automático (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, China).

4.10 Análises Biológicas para Determinação do impacto do OPB sobre a arquitetura e função hepática

4.10.1 Avaliação histopatológica e quantificação da lesão hepática

Para essa etapa, após a eutanásia, o fígado foi removido, lavado em solução fisiológica (NaCl 0,9%), Em seguida, amostras representativas dos lobos lateral esquerdo, medial direito e caudado foram fixadas em formol 10% por 24horas e, depois, transferidas para álcool 95% e rotineiramente processadas e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura para coloração em Hematoxilina e Eosina (HE).

As áreas de necrose produzidas pela administração do acetaminofeno foram fotografadas em aumento de 100x (objetiva de 10x) pela câmera Leica ICC50W acoplada ao microscópio LEICA DM 750. Foram obtidas aleatoriamente 5 imagens de cada amostra de fígado, a análise morfométrica foi realizada com auxílio do sistema de análise de imagem computadorizado Image Pro-Plus (Media Cybernetics Inc), versão 4.5. O limite de cada área necrótica foi determinado manualmente e o valor numérico indicado pelo sistema. A área total de cada imagem também foi mensurada. Estas áreas foram separadamente somadas por animal para cálculo da porcentagem de área lesada em relação à área total analisada.

4.11 Analise da glicemia

A glicemia dos camundongos foi aferida no 1º e no 9º dia de experimentação. Para a aferição de glicose no 1º dia foi coletada uma gota de sangue da cauda dos animais, preferencialmente no mesmo horário, em capela de fluxo laminar, a gota de sangue foi colocada em fitas ACCU-Check Active (Roche, Basileia, Suíça), e inseridas no medidor ACCU-Check Active (Roche) para leitura. Os dados foram coletados e anotados para análises posteriores. Para a aferição de glicose no 9º dia uma gota de sangue da seringa em que foi coletado o sangue por punção intracardíaca foi colocada em fitas ACCU-Check Active (Roche, Basileia, Suíça), e inseridas no medidor ACCU-Check Active (Roche) para leitura. Os dados foram coletados e anotados para análises posteriores.

4.12 Teste do micronúcleo em eritrócitos

Os micronúcleos foram analisados a partir dos eritrócitos do sangue de camundongos coletados por punção intracardíaca. Duas lâminas foram preparadas desenhando uma gota de sangue sobre a lâmina para formar um esfregaço fino, que foi seco ao ar por 24 h, fixado em metanol por 10 min e corado por 40 min com corante Giemsa a 5% (p/v). De acordo com Ribeiro et al (2003), a coloração serve para diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE). Eritrócitos policromáticos (PCE) ou jovens se coram de azul claro e eritrócitos normocromáticos se coram de vermelho-telha. Com os ajustes necessários concluídos, em cada lâmina, verificou-se a presença de micronúcleo e de alterações morfológicas nucleares em 2.000 eritrócitos por lâmina (Nikon® Eclipse 80i, lente de imersão em óleo, 100/1,25). Para a pontuação de micronúcleos, os critérios de Al-Sabti & Metcalfe (1995) foram adotados. Foi anotado o número de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares por lâmina, para análise estatística.

4.13 Análise Estatística

O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as

diferenças entre as análises. Em todos os casos, comparações individuais foram realizadas por meio do pós-teste de Bonferroni (comparações múltiplas). Os resultados foram expressos como média \pm EPM e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p<0,05$.

REFERENCIAS

- AHMED, M. F.; RAO, A. S.; THAYYLL, H.; AHMED, S. R. Role of *Melia azedarach* leaf extract in Paracetamol Induced Hepatic damage in rats. **Pharmacognosy Journal**, v.3, n.21, p.60-64, 2011.
- AKAKPO, J.Y.; JAESCHKE, M.W.; RAMACHANDRAN, A.; CURRY, S.C.; RUMACK, B.H.; JAESCHKE, H. Delayed administration of N-acetylcysteine blunts recovery after an acetaminophen overdose unlike 4-methylpyrazole. **Archives of Toxicology**, v. 95, p. 3377–3391, 2021.
- ALMEIDA, A.S.; FALEIROS, A.C.G.; TEIXEIRA, D.N.S.; COTA, U.A.; CHICA, J.E.L. Valores de referência de parâmetros bioquímicos no sangue de duas linhagens de camundongos. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v.44, n.6, p.429-432, 2008.
- ALSTEDT, U.; VOIGT, K.; JÄGER, M.C.; KNUVVEN-SCHEWEIZER, G.; ZABLTSKI, Y.; STRUBE, C.; WENZEL, C. Rumen and Liver Fluke Infections in Sheep and Goats in Northern and Southern Germany. **Animals**, v. 12, n. 7, p. 876, 2022.
- ANDRADE, R. J. et al. Idiosyncratic drug hepatotoxicity: a 2008 update. **Expert review of clinical pharmacology**, v. 1, n. 2, p. 261-276, 2008.
- ANTER, J.; CAMPOS-SÁNCHEZ, J.; EL HAMSS, R.; ROJAS-MOLINA, M.; MUÑOZ-SERRANO, A.; ANALLA, M.; ALONSO-MORAGA, A. Modulation of genotoxicity by extra-virgin olive oil and some of its distinctive components assessed by use of the *Drosophila* wing-spot test. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.703, i.2, p.137-142, 2010.
- ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Normas técnicas para identificação e qualidade de óleos e gorduras vegetais, 1999.
- AQUINO, F. G.; SILVA, M. R.; RATTER, J. A.; RIBEIRO, J.F.; VILELA, M.F.; OLIVEIRA, M.C. Distribuição Geográfica Das Espécies *Acrocomia Aculeata* (Jacq.) Lodd. Ex Mart. E *Caryocar Brasiliense Cambess.* No Bioma Cerrado 1. **IX Simpósio Nacional Cerrado - Desafios e estratégias para o equilíbrio entre sociedade, agronegócio e recursos naturais.** II Simpósio Internacional Savanas Tropicais. ParlaMundi, Brasília/DF, 2008.

ARENA, A. C; JORGE, B.; SILVA, M.; DE BARROS, A.; FERNANDES, A.; NÓBREGA, R.; MARTINEZ, E.; CARDOSO, C.; ANSELMO-FRANCI, J.; MUZZI, R. J. A. Acrocomia aculeata oil: Beneficial effects on cyclophosphamide-induced reproductive toxicity in male rats. **Andrologia**, 50(6): e13028, 2018

ARISTONE, F.; LEME, F. J. U. C. Como fazer farinha de Bocaiúva: Guia completo e livro de receitas (Manual didático). **Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS, Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico-CNPq**, Campo Grande, MS, 2006.

BARROS, A. J. C., MESQUITA, A.F.L., AGUIAR, T.D.C., BRASIL, S.F.R., MORAIS, I.C.O. Lesão hepática induzida por medicamentos e o papel do farmacêutico no seu manejo clínico. UniCatólica, **Mostra Científica da Farmácia**. Quixadá, 2018.

BJÖRNSSON, E. Review article: drug-induced liver injury in clinical practice. **Aliment Pharmacol Ther**, 32(3), 3-13, 2010.

BJÖRKLUND, C.; BAGE, R.; MORRELL, J.; DE VERDIER, K.; HARTZELL, L.N.; KJELLINBRO, N.; BELÁK, K.; BERNODT, K.; GAVIER-WIDEN, D. Diseases and causes of death among alpacas in Sweden: a retrospective study. **Veterinary Record Open**, v. 6, n. 1, p. e000239, 2019.

BLACHIER, M.; LELEU, H.; PECK-RADOSAVLJEVIC, M.; VALLA, D.; ROUDOT-THORAVAL, F. The burden of liver disease in Europe: A review of available epidemiological data. **Journal of Hepatology**. v. 58, n. 3, p. 593–608, 2013.

BLACHIER, M.; LELEU, H.; PECK-RADOSAVLJEVIC, M.; VALLA, D.C.; ROUDOT-THORAVAL, F. J. J. O. H. The burden of liver disease in Europe: a review of available epidemiological data. **Journal of Hepatology**, v.58, i.3, p.593-608, 2013.

BLATT, C.; BECKER, M. W.; LUNARDELLI, M. J. M. Lesão hepática induzida por medicamentos: qual o papel do farmacêutico clínico. **Revista Brasileira de Farmácia Hospitalar e Serviços de Saúde**, v. 7, n. 4, 2016.

BRENNAN, P. N.; DILLON, J. F.; TAPPER, E. B. Gamma-Glutamyl Transferase (γ -GT) –an old dog with new tricks? **Liver International**, v.42, i.1, p.9–15, 2022.

CALDER, P. C. Omega-3 fatty acids and inflammatory processes: from molecules to man. **Biochemical Society Transactions**, v.45 i.5, p.1105-1115,, 2017.

CHALASANI, N., BONKOVSKY, H. L., FONTANA, R., LEE, W., STOLZ, A., TALWALKAR, J., REDDY, K. R., BARNHART, H., GU, J. & SERRANO, J. Features and outcomes of 899 patients with drug-induced liver injury: the DILIN Prospective Study. **Gastroenterology**, 148, 1340-1352, 2015.

CHEN, M. et al. Drug-induced liver injury: Interactions between drug properties and host factors. **Journal Hepatology**, v. 63, n. 2, p. 503-14, 2015.

CHUBA, C.A.M.; TOMMASELLI, M.A.G.C.M.; SANTOS, W.L.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J. Parâmetros Biométricos Dos Cachos e Frutos Da Bocaiúva. **XX Congresso Brasileiro de Fruticultura**. 54th Annual Meeting of the Interamerican Society for Tropical Horticulture, Vitória/ES, 2008.

CLAYTON, M. J.; DAVIS, T.Z.; KNOPPEL, E.L.; STEGELMEIER, B. Hepatotoxic plants that poison livestock. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.36, n.3, p.715–723, 2020.

CODEX ALIMENTARIUS. Normas para gorduras e óleos de Fontes Vegetais, Seção 2. Padrões do Codex Alimentarius para Óleos Vegetais Nomeados. Codex Alimentarius-Stan 210. 1999.

COIMBRA, M. C.; JORGE, N. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. **Food Research International**. v.44, i.7, p.2139-2142, 2011.

CORNELIUS, C. E. Liver function tests in the differential diagnosis of hepatotoxicity. **Hepatotoxicology**. ed.1, p. 181–213, 2020.

CORNICK, J. L.; CARTER, G. K.; BRIDGES, C. H. Kleingrass-associated hepatotoxicosis in horses. **Journal of the American Veterinary Medical Association**. v.193, n.8, p. 932–935, 1998.

COSTA, G. L. A.; BUCCINI, D. F.; ARRUDA, A. L. A.; FAVARO, S. P.; MORENO, S. E. Phytochemical profile, anti-inflammatory, antimutagenic and antioxidant properties of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. pulp oil. **Food Science and Technology**. v.40 (4), p.963-971, 2020.

COSTA, L. M.; MELO, M. L. P; REIS, F. V. F.; MONTEIRO, M. C.; SANTOS, S. M.; GOMES, B. A. Q.; SILVA, L. H. M. Comparison of the effects of Brazil nut oil and soybean oil on the cardiometabolic parameters of patients with metabolic syndrome: a randomized trial. **Nutrients**. v.12, n.1, p.46, 2020.

COVAS, M.I.; NYYSSÖNEN, K.; POULSEN, H. E.; KAIKKONEN, J.; ZUNFT, H.J. F.; KIESEWETTER, H.; GADDI, A.; DE LA TORRE, R.; MURSU, J.; BÄUMLER, H.; NASCETTI, J.; SALONEN, J.T.; FITÓ, M.; VIRTANEN, J.; MARRUGAT, J.

The effect of polyphenols in olive oil on heart disease risk factors: a randomized trial. **Annals of Internal Medicine.** v.145, i.5, p.333-341, 2006.

CURRAN, J. M.; SUTHERLAND, R. J.; PEET, R. L. A screening test for subclinical liver disease in horses affected by pyrrolizidine alkaloid toxicosis. **Australian Veterinary Journal.** v. 74, n. 3, p. 236–240, 1996.

DANAN, G.; TESCHKE, R. Roussel Uclaf Causality Assessment Method for drug-induced liver injury: present and future. **Frontiers in Pharmacology**, v. 10, 2019.

DA SILVA, P. V.; RAMIRO, M. M.; IRIGUCHI, E. K.; CORRÊA, W. A.; LOWE, J.; CARDOSO, C. A.; ARENA, A. C.; KASSUYA, C. A.; MUZZI, R.M. Antidiabetic, cytotoxic and antioxidant activities of oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp. **Natural Product Research.** v.33, i.16, p.2413-2416, 2019.

DAVIS, L. E. Reações medicamentosas adversas. In: Ettinger SJ, Feldman EC. **Tratado de medicina interna veterinária.** cap. 62, 4. ed, vol. 1. São Paulo: Manole; 1997.

DAVOUDI, S. Study of hepatic problems in livestock. **European Journal of Zoological Research.** v.2, n.4, p.124-132, 2013.

DE OLIVEIRA, M. L. M.; NUNES-PINHEIRO, D. C. S.; TOMÉ, A. R.; MOTA, E. F.; LIMA-VERDE, I. A.; PINHEIRO, F. G. M.; CAMPELLO, C. C.; MORAIS, S. M. *In vivo* topical anti-inflammatory and wound healing activities of the fixed oil of *Caryocar coriaceum* Wittm. seeds. **Journal of Ethnopharmacology.** v.129, (2), p. 214-219, 2010.

DERESZYNSKI, D. M.; CENTER, S.A.; RANDOLPH, J.F.; BROOKS, M.B.; HADDEN, A.G.; PALYADA, K.S.; McDONOUGH, S.P.; MESSICK, J.; STOKOL, T.; BISCHOFF, K.L.; GLUCKMAN, S.; SANDERS, S.Y. Clinical and clinicopathologic features of dogs that consumed foodborne hepatotoxic aflatoxins: 72 cases (2005–2006). **Journal of the American Veterinary Medical Association.** v. 232, n. 9, p. 1329–1337, 2008.

DEVARBHAVI, H. An Update on Drug-induced Liver Injury. **Journal of clinical and experimental hepatology**, v. 2, n. 3, p. 247-259, 2012.

DEVRIES, P.J; WALLA, T.R; LANDE, R. Species diversity and community structure in neotropical fruit-feeding butterflies. **Biological Journal of the Linnean Society.** v.74, p.1-15, 2001.

DEVRIES, S.E.; GALEY, F.D.; NAMIKOSHI, M.; WOO, J.C. Clinical and pathologic findings of blue-green algae (*Microcystis aeruginosa*) intoxication in a

dog. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 5, n. 3, p. 403–408, 1993.

DIVERS, T. J. The equine liver in health and disease. **AAEP Annual Convention** - Las Vegas by American Association of Equine Practitioners. 2015.

DUNAYER, E. K. New findings on the effects of xylitol ingestion in dogs. **Veterinary Medicine-Bonner Springs then Edwardsville.** v. 101, n. 12, p. 791-798, 2006.

DYCE K. M., SACK M. O., WENSING C.J. G. Tratado de anatomia veterinária, 3 ed., Elsevier, Rio de Janeiro, cap. 28, p. 663-664, 2004.

ELLERO, N.; LANCI, A.; AVALLONE, G.; MARIELLA, J.; CASTAGNETTI, C.; MUSCATELLO, L.V.; DI MAIO, C.; FRECCERO, F. The first case of Tyzzer's disease in a young foal in Italy: a case report. **Veterinaria Italiana.** v. 57, n. 3, 2021.

ENSLEY, S. Evaluating mineral status in ruminant livestock. **Veterinary Clinics: Food Animal Practice.** v. 36, n. 3, p. 525–546, 2020.

ESTRUCH, R.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A.; CORELLA, D.; SALAS-SALVADÓ, J.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; ARÓS, F.; CONDE, M.; LAHOZ, C.; LAPETRA, J.; SÁEZ, G.; ROS, E. Effects of a Mediterranean-style diet on cardiovascular risk factors: a randomized trial. **Annals of Internal Medicine.** v.145. n.1, p. 1-11, 2006.

FALUDI, A. A.; IZAR, M.C.O.; SARAIWA, J.F.K.; CHACRA, A.P.M.; BIANCO, H.T.; AFIUNE NETO, A.; SALGADO FILHO, W. ATUALIZAÇÃO DA DIRETRIZ BRASILEIRA DE DISLIPIDEMIAS E PREVENÇÃO DA ATEROSCLEROSE. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia.** v.109, n.2, supl.1, 2017.

FAO. Codex Alimentarius: Standard for named vegetable oils Codex Stan 210-1999. Roma: FAO/WHO, 15 p. 2019.

FERGUSON, D.; CROWE, M.; MCLAUGHLIN, L.; GASCHEN, F. Survival and prognostic indicators for cycad intoxication in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v. 25, n. 4, p. 831–837, 2011.

FERGUSON, D.; CROWE, M.; MCLAUGHLIN, L.; GASCHEN, F. Survival and prognostic indicators for cycad intoxication in dogs. **Journal of Veterinary Internal Medicine.** v.25, p. 831-837, 2011.

FERNÁNDEZ, I.; PEÑA, A.; DEL TESO, N.; PÉREZ, V.; RODRÍGUEZ-CUESTA, J. Clinical biochemistry parameters in C57BL/6J mice after blood collection from

the submandibular vein and retroorbital plexus. **Journal of the American Association for Laboratory Animal Science.** v.49, n.2, p.202-206, 2010.

FONTANA, R. J. Pathogenesis of idiosyncratic drug-induced liver injury and clinical perspectives. **Gastroenterology.** v.146, n.4, p. 914-928, 2014.

FREITAS, A.F.; CARDIA, G.F.E.; AMBRÓSIO, R.B.; AGUIAR, R.P.; SILVACOMAR, F.M.S.; SPIRONELLO, R.A. Hepatoprotective Effectof Silymarin (*Silybum marianum*) on Hepatotoxicity Induced by Acetaminophen in Spontaneously Hypertensive Rat. Evidence-Based Complementary and Alternative. **Medicine**, 2015.

FRUITS from America: an ethnobotanical inventory *Acrocomia aculeata*. Disponível em: Acesso em: 8 set. 2022.

GAMBERINI, M. T.; SKORUPA, L.A.; LAPA, J.A. Inhibition of gastric secretion by a water extract from Baccharis triptera, **Mart. Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 86 Suppl 2, p. 137-9, 1991.

GANGER, D. R., RULE, J., RAKELA, J., BASS, N., REUBEN, A., STRAVITZ, R. T., SUSSMAN, N., LARSON, A. M., JAMES, LAURA, CHIU, CHARLES, & LEE, W. M. Acute liver failure of indeterminate etiology: a comprehensive systematic approach by an expert committee to establish causality. **Am Journal Gastroenterol.**, 113(9), 1319, 2018.

GARCÍA, J. A.; NAVARRO, M.A.; FRESNEDA, K.; UZAL, F.A. *Clostridium piliforme* infection (Tyzzer disease) in horses: retrospective study of 25 cases and literature review. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 34, n. 3, p. 421–428, 2022.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

GILLINGHAM, L.G.; HARRIS-JANZ, S.; JONES, P.J.H. Dietary monounsaturated fatty acids are protective against metabolic syndrome and cardiovascular disease risk factors. **Lipids.** v.46, n.3, p.209-228, 2011.

GIORDANO, C.; RIVAS, J.; ZERVOS, X. An update on treatment of drug-induced liver injury. **Journal of Clinical and Translational Hepatology**, v. 2, n.2, p. 74-79, 2014.

GONZÁLEZ, A.; FERREIRA, F.; VASQUEZ, A.; MOYNA, P. Biological screening of Uruguayan medicinal plants. **Journal Ethnopharmacol**, v. 39, n. 3, p. 217-20, 1993.

GONZÁLEZ-MONTAÑA, J.R.; ESCALERA-VALENTE, F.; ALONSO, A. J.; LOMILLOS, J. M.; ROBLES, R.; ALONSO, M. E. Relationship between Vitamin B12 and Cobalt Metabolism in Domestic Ruminant: An Update. **Animals**, v.10, n.10, p.1855, 2020.

GONZÁLEZ-MONTAÑA, J.R.; ESCALERA-VALENTE, F.; ALONSO, A.J.; LOMILLOS, J.M.; ROBLES, R.; ALONSO, M.E. Relationship between Vitamin B12 and Cobalt Metabolism in Domestic Ruminant: An Update. **Animals (Basel)**. v. 10, n. 10, p. 1855, 2020.

GROSS, J. J. Hepatic Lipidosis in Ruminants. **Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice**. v.39, n.2, p.371-383, 2023.

GU, X.; MANAUTOU, J. E. Molecular mechanisms underlying chemical liver injury. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 14, p. e4, 2012.

GUIDONI, M.; SCHERER, M.M.C.; FIGUEIRA, M.M.; SCHMITT, E.F.P.; DE ALMEIDA, L.C.; SCHERER, R.; BOGUSZ, S.; FRONZA, M. Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 52 (2):e8209, 2019.

HAN, D. et al. Signal transduction pathways involved in drug induced liver injury. Handb. **Experimental Pharmacology**. 196, 267–310, 2010.

HEIDARIAN, E.; RAFIEIAN-KOPAEI, M. Protective effect of artichoke (*Cynara scolymus*) leaf extract against lead toxicity in rat. **Pharmaceutical Biology**. v. 51, n.9, p. 1104-1109, 2013.

HEUBI, J. E.; BARBACCI, M. B.; ZIMMERMAN, H. J. Therapeutic misadventures with acetaminophen: hepatotoxicity after multiple doses in children. **Journal Pediatric**, v. 132, n. 1, p. 22-7, 1998.

HIANE, P. A. FILHO, M. M. R.; RAMOS, M. I. L.; MACEDO, M. L. R. Bocaiúva, Acrocomia aculeate (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. **Brazilian Journal Food Technology**, v.8, p.256-259, 2005.

HIANE, P. A.; BALDASSO, P. A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. **Food Science and Technology**. v.26, n.3, p. 683-689, 2006.

HILST, P. Fruto e semente de macaúba. Disponível em: <<http://www.paulohilst.com/uploads/9/3/5/1/9351412/3553528.jpg>>. Acesso em: 15 dez. 2022.

HINSON, J.A.; ROBERTS, D.W.; JAMES, L.P. Mechanisms of acetaminophen-induced liver necrosis. *Handb Experimental Pharmacology*. 196, 369-405, 2010.

HORAK, J.; HORKÝ, J.; RABL, M. Haemoperfusion through activated charcoal in dogs with fulminant liver failure. *Digestion*. v. 20, n. 1, p. 22–30, 1980.

JAESCHKE, H. MCGILL, M. R.; RAMACHANDRAN, A. Current issues with acetaminophen hepatotoxicity--a clinically relevant model to test the efficacy of natural products. *Life Science*, v. 88, n. 17-18, p. 737-45, 2011.

JAESCHKE, H.; XIE, Y.; MCGILL, M. R. Acetaminophen-induced Liver Injury: from Animal Models to Humans. *Journal of Clinical and Translational Hepatology*. v.2, n.3, p. 153-161, 2014.

JERICÓ, M. M. **Tratado de medicina interna de cães e gatos**. Márcia Marques Jericó, Márcia Mery Kogika, João Pedro De Andrade Neto. - 1. ed. - Rio de Janeiro: Roca, 2015. ISBN 978-85-277-2666-5.

JOHNSON, A. L.; DIVERS, T.J.; FRECKLETON, M.L.; MCKENZIE, H.C.; MITCHELL, E.; CULLEN, J.M.; MCDONOUGH, S.P. Fall panicum (*Panicum dichotomiflorum*) hepatotoxicosis in horses and sheep. *Journal of Veterinary Internal Medicine*. v. 20, n. 6, p. 1414–1421, 2006.

JU, J.; PICINICH, S. C.; YANG, Z.; ZHAO, Y.; SUH, N.; KONG, A.; YANG, C. S. Cancer-preventive activities of tocopherols and tocotrienols. *Carcinogenesis*. v.31, n.4, p.533-542, 2010.

JUNIOR, J. B. S.; DUTRA, R.; FRITZEN, M. Estudo do uso do paracetamol realizado em uma farmácia comercial. Santa Catarina. *Revista Eletrônica Estácio Saúde*. V. 2, N. 2, P. 14 – 21, 2013.

KALUGNIY, I. I.; MARKOVA, D.S.; YASHIN, A.V.; PRUSAKOV, A.V.; PONAMAREV, V.S.; ANDREEVA, N.L. Diagnosis of hepatopathy in Holstein cattle with metabolic disorders. *IOP Conference Series: Earth and Environmental Science*. v.723 022029, 2021.

KANTOLA, T.; KANTOLA, T.; KOIVUSALO, A.; HÖCKERSTEDT, K.; ISONIEMI, H. Early molecular adsorbents recirculating system treatment of amanita

mushroom poisoning. **Therapeutic Apheresis and Dialysis.** v.13, n.5, p.399–403, 2009.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Reviews Drug Discovery.** v.4, n.6, p. 489-499, 2005.

KON, K. et al. Role of apoptosis in acetaminophen hepatotoxicity. **Journal of Gastroenterology Hepatology**, v. 22 Suppl 1, p. S49-52, 2007.

KUMAR, G. et al. Hepatoprotective activity of *Trianthema portulacastrum* L. against paracetamol and thioacetamide intoxication in albino rats. **Journal Ethnopharmacol**, v. 92, n. 1, p. 37-40, May 2004. ISSN 0378-8741.

LAST-MMEDVET, R. D. Pyrrolizidine Alkaloid Poisoning in Horses. **South African Veterinary Association.** 2021. Disponível em: <https://www.sava.co.za/vetnews/2016/2021%20November/VN%20CPD%20November%202021.pdf>

LEAL, L. N.; DOELMAN, J.; KEPPLER, B.R.; STEELE, M.A.; MARTÍN-TERESO, J. Preweaning nutrient supply alters serum metabolomics profiles related to protein and energy metabolism and hepatic function in Holstein heifer calves. **Journal of Dairy Science**, v.104, n.7, p.7711–7724, 2021.

LEE, H.S.; LI, L.; KIM, H.K.; BILEHAL, D.; LI, W.; LEE, D.S.; KIM, Y.H. The protective effects of *Curcuma longa* Linn. extract on carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity in rats via upregulation of Nrf2. **Journal of Microbiology and Biotechnology**. v.20, n.9, p. 1331-1338, 2010.

LEE, W. M. Drug-induced hepatotoxicity. **The New England Journal of medicine**. v.349, n.5, p.474-485, 2003.

LEE, S.E., HWANG, H.J., HA, J.S., JEONG, H.S., KIM, J.H. Screening of medicinal plant extracts for antioxidant activity. **Life Sciences**. v.73. 167-79, 2003.

LESCANO, C.; OLIVEIRA, I.P.; SILVA, L.R.; BALDIVIA, D.S.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J.; ARRUDA, E.J.; MORAES, I.C.F.; LIMA, F.F. Nutrients content, characterization and oil extraction from *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. fruits. **African Journal of Food Science**. v.9, n.3, p.113-119, 2015.

LI, X.; LIU, R.; ZHANG, L.; JIANG, Z. The emerging role of AMP-activated protein kinase in cholestatic liver diseases. **Pharmacological Research**. v.125 (Pt B), p.105-113, 2017.

LI, X.; SUN, R.; LIU, R. Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities. **Pharmacological Research.** v.144, p. 210-226, 2019.

LITOVITZ, T. L.; KLEIN-SCHWARTZ, W.; WHITE, S. Annual report of the American Association of Poison Control Centers Toxic Exposure Surveillance System. **American Journal Emergency Medicine**, v. 18, n. 5, p. 517-74, 2000.

LLOVET, J. M.; KELLEY, R. K.; AUGUSTO, V.; SINGAL, A. G.; ELI, P.; ROAYAIE, S.; LENCIONI, R.; KOIKE, K.; ZUCMAN-ROSSI, J.; FINN, R.S. Hepatocellular carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers.** v. 7, n.6, 2021.

LOPES, J.; MATHEUS, M. E. Risco de hepatotoxicidade do paracetamol (Acetaminofem). **Revista Brasileira de Farmácia.** V. 93, N. 4, P. 411–414, 2012.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas. **Instituto Plantarum.** p.542, Nova Odessa/SP, 2002. Disponível em: <https://www.infraestruturaemeioambiente.sp.gov.br/institutodebotanica/2002/01/plantas-medicinais-no-brasil-nativas-e-exoticas/>

LORENZI, G.M.A.C. *Acrocomia aculeata* Arecaceae: Bases para o extrativismo sustentável. Curitiba: Universidade Federal do Paraná. [Tese de Doutorado]. 2006.

MADRIGAL-SANTILLÁN, E.; MADRIGAL-BUJAIDAR, E.; ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I.; SUMAYA-MARTÍNEZ, M. T.; GUTIÉRREZ-SALINAS, J.; BAUTISTA, M.; MORALES-GONZÁLEZ, A.; GONZÁLEZ-RUBIO, M.G.; AGUILAR-FAISAL, J. L.; MORALES-GONZÁLEZ, J.A. Review of natural products with hepatoprotective effects. **World Journal of Gastroenterology.** v.20, n.40, p.14787-14804, 2014.

MALHI, H.; GORES, G. J.; LEMASTERS, J. J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S31-44,2006.

MCGILL, M.R.; JAESCHKE, H. Metabolism and disposition of acetaminophen: recent advances in relation to hepatotoxicity and diagnosis. **Pharmaceutical Research;** 30: (9): 2174- 2187, 2010.

MANTHORPE, E. M.; JERRETT, I.V.; RAWLIN, G.T.; WOOLFORD, L. Clinical and pathologic features of acute bovine liver disease in Australia. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 33, n. 5, p. 875–883, 2021.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006. Instrução para identidade e qualidade de vegetais refinados óleos. Diário Oficial da União, 26/12/2006, Seção 1, dezembro de 2006. Disponível em:

http://www.azeiteonline.com.br/wp-content/uploads/2011/04/anvisa-instrucao_normativa49-de-22-12-2006-oleos-vegetais.pdf. (Acesso: 05 de março 2023).

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa para lista de espécies vegetais autorizadas, as designações, a composição de ácidos graxos e os valores máximos de acidez e de índice de peróxidos para óleos e gorduras vegetais. 15 de março de 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-87-de-15-de-marco-de-2021-309008143>. (Acesso em 10 de junho de 2023).

MARYCZ, K.; SZLAPKA-KOSARZEWSKA, J.; GEBUREK, F.; KORNICKA-GARBOWSKA, K. Systemic Administration of Rejuvenated Adipose-Derived Mesenchymal Stem Cells Improves Liver Metabolism in Equine Metabolic Syndrome (EMS)- New Approach in Veterinary Regenerative Medicine. **Stem Cell Reviews and Reports.** v. 15, p. 842–850, 2019.

MATTOS A. A. Tratado de hepatologia, 1 ed. Rubio, Rio de Janeiro, p. 960, 2010.

MEIRA, C.; SILVA, R. C.; MOYANO, M.; MORAIS, N.; LAGUNA, P.; NERY, F.; PINTO, A. Paracetamol: para além da toxicidade hepática. **Associação Cuidados Intermédios Médicos.** V. 2, P. 26-31, 2013.

MCGILL, M. R.; WILLIAMS, C.D.; XIE, Y.; RAMACHANDRAN, A.; JAESCHKE, H. The mechanism underlying acetaminophen-induced hepatotoxicity in humans and mice involves mitochondrial damage and nuclear DNA fragmentation. **Journal Clinic Investigation,** v. 122, n. 4, p. 1574-1583, 2012.

MITCHELL, I.R., HUGHES, H., LAUTERBURG, B.H., SMITH, C., V. Chernical nature of reactive intermediates as determinant of toxicologocal responses. **Archives of Endocrinology and Metabolism Rev.** u:539-553, 1992.

MILAGRES, E. A. N.; MEGUERIAN, B. A.; CARVALHO, V. S.; LOBATO, V.; ARRUDA, L.S.; FIUT, M.A. Eficácia das plantas medicinais *Cynara scolymus* L. e *Silybum marianum* (L.) Gaertn em relação ao dano hepático: um estudo de revisão. **Vittalle - Revista de Ciências da Saúde.** v.32, n.3, p.187-201, 2020.

MILEWSKI, L. M.; KHAN, S. A. An overview of potentially life-threatening poisonous plants in dogs and cats. **Journal of Veterinary Emergency and Critical Care.** v.16, n.1, p.25–33, 2006.

MILLS, C. F. Cobalt deficiency and cobalt requirements of ruminants. **Recent Advances in Animal Nutrition,** p. 129–141, 1981.

MISSOURI BOTANICAL GARDEN. *Acrocomia aculeata*. Disponível em: <<http://www.mobot.mobot.org/cgi-bin/search>> Acesso em: 16 out. 2022.

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

MURIEL, P.; RIVERA-ESPINOZA, Y. Beneficial drugs for liver diseases. **J Appl Toxicol**, v. 28, n. 2, p. 93-103, 2008.

NEVZOROVA, Y. A.; BOYER-DIAZ, Z.; CUBERO, F. J.; GRACIA-SANCHO, J. Animal models for liver disease—a practical approach for translational research. **Journal of Hepatology**. v.73, n.2, p. 423-440, 2020.

NI, Y.; ZHAO, L.; YU, H.; MA, X.; BAO, Y.; RAJANI, C.; LOO, L. W.Y.M.; SHVETSOV, Y.B.; YU, H.; CHEN, T.; ZHANG, Y.; WANG, C.; HU, C.; SU, M.; XIE, G.; ZHAO, A.; JIA, WEI.; JIA, W. Circulating unsaturated fatty acids delineate the metabolic status of obese individuals. **EBioMedicine**. v.2, n.10, p.513-1522, 2015.

NISSENHOHN, M.; ROMÁN-VIÑAS, B.; SÁNCHEZ-VILLEGAS, A.; PSICOPPO, S.; SERRA-MAJEM. The Effect of the Mediterranean Diet on Hypertension: A Systematic Review and Meta-Analysis. **Journal of Nutrition Education and Behavior**. v. 48, n. 1, p. 42-53, ISSN 1878-2620, 2016.

NISSENHOHN, M.; ROMÁN-VIÑAS, B.; SÁNCHEZ-VILLEGAS, A.; PISCOPO, S.; SERRA-MAJEM, L. The effect of the Mediterranean diet on hypertension: a systematic review and meta-analysis. **Journal of Nutrition Education and Behavior**. v.48, n.1, p. 42-53, 2016.

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

NUNES, A. Óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart.) com alta qualidade: processo de refino e termoestabilidade. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS, 2013.

NUNES, A.A.; BUCCINI, D.F.; JAQUES, J.A.; PORTUGAL, L.C.; GUIMARÃES, R.C.; FAVARO, S.P.; CALDAS, R.A.; CARVALHO, C.M.E. Effect of *Acrocomia aculeata* kernel oil on adiposity in type 2 diabetic rats. **Plant Foods for Human Nutrition**. v.73, n.1, p.61-67, 2018.

OLIVEIRA, A., OLIVEIRA, N.A., RESENDE, U.M., MARTINS, P.F.R.B. Ethnobotany and traditional medicine of the inhabitants of the Pantanal Negro sub-region and the raizeiros of Miranda and Aquidauana, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Brazilian Journal of Biology**, v.71, p.283-289, 2011.

OTT, E. A.; SMITH, W.H.; HARRINGTON, R.B.; PARKER, H.E.; BEESON, W.M. Zinc toxicity in ruminants. IV. Physiological changes in tissues of beef cattle. **Journal of Animal Science**. v. 25, n. 2, p. 432–438, 1966.

PANIZZA S., ROCHA A. B., GECCHI R., SILVA R. A. P., Rev. Ciênc. Farmac., 10, 101-106, 1998.

PENHA F.M. et al. Evaluation of permeation of macauba oil and n-hexane mixtures through polymeric commercial membranes subjected to different pre-treatments. **Journal Food Engineering**, 155:79–86, 2015.

POVEDA, E.; AYALA, P.; RODRÍGUEZ, M.; ORDÓÑEZ, E.; BARACALDO, C.; DELGADO, W.; GUERRA, M. J. B. Efecto del suplemento de aceites vegetales sobre el perfil lipídico en ratas Wistar. **Biomédica**. v.25, n.1, p.101-109, 2005

PUSCHNER, B.; ROSE, H. H.; FILIGENZI, M. S. Diagnosis of Amanita toxicosis in a dog with acute hepatic necrosis. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation**. v.19, n.3, p.312–317, 2007.

RADOSTITS, O.M.; GAY C.C.; BLOOD, D.C.; HINCHCLIFF, K.W. **Clínica Veterinária: Um Tratado de Doenças dos Bovinos, Ovinos, Suíños, Caprinos e Equinos**. p.677-680. 9^a ed. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, p.1737. 2002.

RAMALINGAM, M., KIM, H.; LEE, Y.; LEE, Y. Phytochemical and pharmacological role of liquiritigenin and isoliquiritigenin from radix glycyrrhizae in human health and disease models. **Frontiers in Aging Neuroscience**. v. 10, p.348, 2018.

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

RAMSAUER, A. S.; BADENHORST, M.; CAVALLERI, J. Equine parvovirus hepatitis. **Equine Veterinary Journal**. v. 53, n. 5, p. 886–894, 2021.

RATTER, J. A.; BRIDGEWATER, S.; RIBEIRO, J. F. Analysis of the floristic composition of the Brazilian Cerrado vegetation III: comparison of the woody vegetation of 376 areas. **Edinburgh Journal of Botany**. v.60, n.1, p.57-109, 2003.

REYES-GARCIA, V. The relevance of traditional knowledge systems for ethnopharmacological research: theoretical and methodological contributions. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v.6, n.1, p.1- 12, 2010.

ROBLEDO, P. C. Tratamiento y prevención de patologías hepáticas equinas con remedios homeopáticos. **Revista Médica de Homeopatía**, v. 8, n. 3, p. 128–133, 2015.

ROMUALDO, G. R.; SOUZA, I. P.; SOUZA, L. V.; PRATA, G. B.; FRAGA-SILVA, T.F.C.; SARTORI, A.; BORGUINI, R. G.; SANTIAGO, M.C.P.A.; FERNANDES, A.A.H.; COGLIATI, B.; BARBISAN, L.F. Beneficial effects of anthocyanin-rich peels of Myrtaceae fruits on chemically-induced liver fibrosis and carcinogenesis in mice. **Food Research International**. v.139, 109964, 2021.

ROWE, I. A. Lessons from epidemiology: the burden of liver disease. **Digestive Diseases**. v.35, n.4, p.304-309, 2017.

ROWDEN, A. K., Norvell, J., Eldridge, D.L., Kirk. M.A. Updates on acetaminophen toxicity. **Medical Clinics of North America**, v. 89, p. 1145-59, 2005.

RÜCKERT, C.; EMMERICH, I.; HERTZSCH, R.; VERVUERT, I. *Pyrrolizidine alkaloids* in commercial feedstuffs for horses. **Equine Veterinary Journal**. v.51, n.4, p.495–499, 2019.

RUSSELL, R. M. The enigma of β-carotene in carcinogenesis: what can be learned from animal studies. **The Journal of Nutrition**. v.134, n.1, p.262S-268S, 2004.

SALAS-SALVADÓ, J.; CASAS-AGUSTENCH, P.; MURPHY, M.M; LÓPEZ-URIARTE, P.; BULLÓ, M. The effect of nuts on inflammation. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**. v. 17, n. 1, p. 333-336, 2008.

SALAS-SALVADÓ, J.; GARCIA-ARELLANO, A.; ESTRUCH, R.; MARQUEZ-SANDOVAL, F.; CORELLA, D.; FIOL, M.; GÓMEZ-GRACIA, E.; VIÑOLES, E.; ARÓS, F.; HERRERA. Components of the Mediterranean-type food pattern and serum inflammatory markers among patients at high risk for cardiovascular disease. **European Journal of Clinical Nutrition**. v.62, n.5, p.651-659, 2008.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CHUBA, C.A.M. Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiúva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. **Revista Brasileira de Fruticultura**. v.33, n.3, p.1023-1028, 2011.

SANTOS, C. M. C., PIMENTA, C. A. M., & NOBRE, M. R. C. The PICO strategy for the research question construction and evidence search. **Revista Latino Americana de Enfermagem**, 15(3), 508-511, 2007.

SANTOS, E.W.; OLIVEIRA, D.C.D.; HASTREITER, A.; SILVA, G.B.D.; BELTRAN, J.S.D.O.; TSUJITA, M.; CRISMA, A.R.; NEVES, S.M.P.; FOCK, R.A.; BORELLI, P. Valores de referência hematológicos e bioquímicos para camundongos das linhagens C57BL/6, Swiss Webster e BALB/c. **Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science**. v.53, n.2, p.138-145, 2016.

SARAIVA, R. A.; ARARUNA, M. K.; OLIVEIRA, R. C.; MENEZES, K. D.; LEITE, G. O.; KERNTOPF, M. R.; COSTA, J. G.; ROCHA, J. B.; TOMÉ, A. R.; CAMPOS, A.R.; MENEZES, I.R.A. Topical anti-inflammatory effect of Caryocar coriaceum Wittm.(Caryocaraceae) fruit pulp fixed oil on mice ear edema induced by different irritant agents. **Journal of Ethnopharmacology**. v.136, n.3: p.504-510, 2011.

SATUÉ, K.; MIGUEL-PASTOR, L.; CHICHARRO, D.; GARDÓN, J.C. Hepatic enzyme profile in horses. **Animals**. v. 12, n. 7, p. 861, 2022.

SEBBEN, V.C.; LUGOCH, R.W.; SCHLINKER, C.S.; ARBO, M.D.; VIANNA R.L. Validação de metodologia analítica e estudo de estabilidade para quantificação sérica do paracetamol. **Revista Brasileira de Patologia Medicina Laboratorial**. 46(2): 143 – 148, 2010.

SCHEX, R.; LIEB, V. M.; JIMÉNEZ, V. M.; ESQUIVEL, P.; SCHWEIGGERT, R. M.; CARLE, R.; STEINGASS, C.B. HPLC-DAD-APCI/ESI-MS_n analysis of carotenoids and α-tocopherol in Costa Rican Acrocomia aculeata fruits of varying maturity stages. **Food Research International**. v.105, p.645-653, 2018.

SHINODA, S.; AOYAMA, T.; AOYAMA, Y.; TOMIOKA, S.; MATSUMOTO, Y. e OHE, Y. Pharmacokinetics/pharmacodynamics of acetaminophen analgesia in Japanese patients with chronic pain. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**. v. 30, n. 1, p. 157-161, 2007.

SCHNABL, B.; BRENNER, D. A. Interactions between the intestinal microbiome and liver diseases. **Gastroenterology**. v.146, n.6, p.1513-1524, 2014.

SHEN, T., LIU, Y., SHANG, J., XIE, Q., LI, J., YAN M, XU, J., NIU, J., LIU, J., WATKINS, P. B., AITHAL, G. P., ANDRADE, R. J., DOU, X., YAO, L., LV, F., WANG, Q., LI, Y., ZHOU, X., ZHANG, Y., ZONG, P., WAN, B., ZOU, Z. Incidence and etiology of drug-induced liver injury in Mainland China. **Gastroenterology**, 156(8), 2230-2241, 2019.

SGRO, C., CLINARD, F., OUAZIR, K., CHANAY, H., ALLARD, C. GUILLEMINET, C., LENOIR, C., LEMOINE, A., & HILLON, P. Incidence of drug-

induced hepatic injuries: a French population-based study. **Hepatology**, 36(2), 451-455, 2002.

SILVA, I. B.; LIMA, I. R.; SANTANA, M.A.N.; LEITE, R. M. P.; LEITE, S. P. *Indigofera suffruticosa* Mill (Fabaceae): Hepatic Responses in Mice Bearing Sarcoma 180. **International Journal of Morphology** (Online), v. 32, p. 1228-1233, 2014.

SILVA, G. C. R.; ANDRADE, M. H. C. Development and simulation of a new oil extraction process from fruit of macauba palm tree. **Journal of Food Process Engineering**. [s. l.], v. 36, p. 134–145, 2019.

STURGILL, M.G.; LAMBERT, G.H. Xenobiotic-induced hepatotoxicity: mechanisms of liver injury and methods of monitoring hepatic function. **Clinical Chemistry** 43:8(B) 1512– 1526, 1997.

TAJIRI, K.; SHIMIZU, Y. Practical guidelines for diagnosis and early management of drug-induced liver injury. **World J Gastroenterol.** Nov 28;14(44):6774-85, 2008.

TESCHKE, R.; ANDRADE, R. J. Drug, herb, and dietary supplement hepatotoxicity. **International Journal of Molecular Sciences**, Sept, v. 17, n. 9, p. 1.488, 2016.

TILAHUN, W. W.; GROSSI, J. A. S.; FAVARO, S. P.; SEDIYAMA, C. S.; GOULART, S. D. M.; PIMENTEL, L. D.; MOTOIKE, S.Y. Increase in oil content and changes in quality of macauba mesocarp oil along storage. **Quality - Food Safety.** v.26, i. OCL, n.20, 2019.

TOLEDO-PEREYRA, L. H. Role of activated carbon hemoperfusion in the recovery of livers exposed to ischemic damage. **Archives of Surgery.** v. 120, n. 4, p. 462–465, 1985.

TORNQUIST, S.J.; CEBRA, C.K.; HENRIKSEN, M.L. Camelids. **Veterinary Cytology**. p.800–808, DOI:10.1002/9781119380559.ch59, 2020.

TORRES, L.R.O.; SANTANA, F.C.; TORRES-LEAL, F.L.; MELO, I.L.P.; YOSHINE, L.T.; MATOS-NETO, E.M.; SEELAENDER, M.C.L.; ARAÚJO, C.M.M.; COGLIATI, B.; MANCINI-FILHO, J. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) almond oil attenuates carbon tetrachloride-induced acute hepatic injury in rats: Antioxidant and anti-inflammatory effects. **Food and Chemical Toxicology.** v.97, p.205-216, 2016.

VARGAS-MENDOZA, N. et al. Hepatoprotective effect of silymarin. **World J. Hepatol.**, v. 6, n. 3, p. 144-149, 2014.

VENTRO, G. J.; YANG, Y.; CHEN, M.; HARMON, C.M. The molecular impact of omega 3 fatty acids on hepatic pro-inflammatory cytokine signaling. **Journal of Pediatric Surgery.** v.52, n.6, p.1020-1025, 2017.

VITEK, L.; HINDS JR, T.D.; STEC, D.E.; TRIBELLI, C. The physiology of bilirubin: health and disease equilibrium. **Trends in Molecular Medicine.** v.29, i.4, p.315-328, 2023.

WACHENHEIM, D. E.; BLYTHE, L. L.; CRAIG, A. M. Characterization of rumen bacterial pyrrolizidine alkaloid biotransformation in ruminants of various species. **Veterinary and Human Toxicology.** v. 34, n. 6, p. 513–517, 1992.

WANG, C.; ZHU, C.; SHAO, L.; YE, J.; SHEN, Y.; REN, Y. Role of bile acids in dysbiosis and treatment of nonalcoholic fatty liver disease. **Mediators of Inflammation.** v. 2019, ID 76599509, 2019.

WIEDENFELD, H.; EDGAR, J. Toxicity of pyrrolizidine alkaloids to humans and ruminants. **Phytochemistry Reviews.** v. 10, p. 137–151, 2011.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A.; NAMIECIŃSKA, M.; OWCZAREK, J. The effect of ibuprofen on bFGF, VEGF secretion and cell proliferation in the presence of LPS in HMEC-1 cells. **Acta Poloniae Pharmaceutica.** v.72, n.5, p.889-894, 2015.

WILLIAMS D.P.; KITTERINHAM N.R.; NAISBITT D.J.; PIRMOHAMED, M. Are chemically reactive metabolites responsible for adverse reactions to drugs? **Current Drug Metabolism;** 3: 351- 366, 2002.

WITTE, S.T.; OSWEILER, G.D.; STAHR, H.M.; MOBLEY, G. *Cocklebur toxicosis* in cattle associated with the consumption of mature Xanthium strumarium. **Journal of Veterinary Diagnostic Investigation.** v. 2, n. 4, p. 263–267, 1990.

WU, S.; TAM, K.; T.Y.; CHANG, C.; CHAO, J.C. Curcumin and saikosaponin a inhibit chemical-induced liver inflammation and fibrosis in rats. **The American Journal of Chinese medicine.** v.38, n.01, p.99-111, 2010.

XU, H.; ZHANG, L.; XU, D.; DENG, W.; YANG, W.; TANG, F.; DA, M. Knockout of calpain-1 protects against high-fat diet-induced liver dysfunction in mouse through inhibiting oxidative stress and inflammation. **Food Science & Nutrition.** v.9, n.1, p.367-374, 2021.

YOON, E.; BABAR, A.; CHOUDHARY, M.; KUTNER, M.; PYRSOPOULOS, N. Acetaminophen-Induced Hepatotoxicity: a Comprehensive Update. *Journal of Clinical and Translational Hepatology.* vol. 4. 131 – 142, 2016.

YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V.; **Em Plantas medicinais sob a ótica da química medicinal moderna**; Yunes, R. A.; Calixto, J. B., eds.; 1^a ed.; Ed. Argos: Chapecó, 2001, cap. 1; Yunes, R. A.; Pedrosa, R. C.; Cechinel Filho, V.; Quim. Nova, 24, 147, 2001.

ZEHETNER, V.; CAVALLERI, J.M.V.; KLANG, A.; HOFER, M.; PREINING, I.; STEINBORN, R.; RAMSAUER, A. Equine Parvovirus-Hepatitis Screening in Horses and Donkeys with Histopathologic Liver Abnormalities. **Viruses**. v. 13, n. 8, p. 1599, 2021.

CAPÍTULO 1

Artigo a seguir foi formatado segundo as normas da revista Phytomedicine

(<https://www.elsevier.com/journals/phytomedicine/0944-7113/guide-for-authors>)

EFEITO DO ÓLEO DA POLPA DA ACROCOMIA ACULEATA (BOCAIUVA) NA PREVENÇÃO DA LESÃO HEPÁTICA AGUDA EM CAMUNDONGOS.

Aline da Rosa Gonçalves Taveira ^a, Ângela Alves Nunes^b, Tereza Cristina Da Silvâ^c, Bruno Cogliati^c; Susana Elisa Moreno^a

- a- Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Sustentabilidade Agropecuária, Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande – MS, 79117900, Brasil;
b- Programa de Graduação em Nutrição. Faculdade Unigran Capital – Campo Grande – MS, 79010-010, Brasil;
c- Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia, USP – São Paulo – SP, 01246904, Brasil.

RESUMO

O fígado é o principal órgão envolvido no processo de metabolização de xenobióticos, desta forma qualquer distúrbio relacionado a sua absorção e/ou excreção podem levar a uma série de lesões, de caráter agudo ou crônico. Dentre as causas da hepatite aguda destaca-se a doença hepática aguda induzida por medicamentos, responsável por amplo espectro de danos hepáticos, que clinicamente, podem se apresentar nas mais variadas formas, variando entre quadros leves de cefaleia e náuseas até quadros graves de insuficiência hepática aguda com necessidade de transplante. Considerando a alta prevalência e a gravidade da doença hepática em todo o mundo, e a falta de alternativas pré e pós clínicas, a busca de novas substâncias com potencial protetivo se faz necessário. A *A. aculeata* conhecida popularmente como bocaiuva, tanto a polpa quanto a castanha possuem inúmeros compostos com atividades biológicas, dentre elas pode-se citar sua atividade anti-inflamatória e antioxidante. Dessa maneira o objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito do óleo da polpa de bocaiuva (OPB) na prevenção da lesão hepática aguda em camundongos. Para tanto foram utilizados 21 animais que foram divididos em três grupos amostrais, um grupo de animais pré tratados com 50µL de OPB por gavagem durante sete dias, enquanto dois grupos controles receberam solução salina no mesmo volume. No oitavo dia, os animais receberam 300 mg/Kg de acetaminofeno i.p. O controle negativo recebeu salina 0,9% i.p. Após 24 horas os animais foram pesados e eutanasiados para coleta das amostras biológicas. Foi realizada a biometria e avaliação macroscópica dos fígados, além das análises histopatológicas determinação dos níveis séricos da enzima alanina

aminotransferase (ALT) como marcados de necrose hepática, glicemia e frequência de micronúcleos em eritrócitos. Os resultados obtidos demonstram que o OPB se encontra dentro das especificações da legislação brasileira para óleos brutos, com parâmetros de qualidade de 2,62 g/100g para índice de acidez, 7,29 meqO₂/kg para índice de peróxidos e 86,65 g/100g para o índice de iodo. Ao analisar o peso dos animais notou-se uma redução de aproximadamente 10% de peso em todos os grupos. As análises de biometria dos fígados nos três grupos experimentais apresentaram diferenças significativas entre si, os fígados do grupo controle não pré tratado pesaram em média 0,17g a mais comparado ao grupo pré tratado com OPB. Ao analisar os níveis séricos de ALT, observou-se redução significativa nos animais pré tratados com o OPB (60U/mL) comparados com o grupo controle não pré tratado (130U/mL) indicando efeito protetor do OBP. Essa diferença também foi evidente nas avaliações macroscópicas e histopatológicas, que revelaram a redução das áreas de lesão hepática nos animais pré tratados com o OPB, conservando a morfologia macroscópica do órgão, microscopicamente o OPB parece ter prevenido o tecido frente lesão hepática causada pelo acetaminofeno, preservando em sua maior parte sua arquitetura normal, na análise quantitativa foi observada áreas necróticas nos fígados dos animais pré tratados com OPB. Houve redução no nível glicêmico no oitavo dia de administração do OPB, no mesmo modo foi observado aumento desses níveis do grupo controle negativo não pré tratado ao oitavo dia. No teste de micronúcleos de eritrócitos foi observado uma redução média de 15% de micronúcleos no grupo pré tratado com OPB. Esses achados sugerem que o óleo da polpa de bocaiuva apresenta propriedades promissoras na proteção contra lesões hepáticas agudas, podendo representar uma alternativa terapêutica valiosa para o tratamento e prevenção dessas condições. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar completamente os mecanismos de ação e o potencial terapêutico do OPB nesse contexto.

Palavras-chave: óleo macaúba, hepatite não alcoólica, acetaminofeno, hepatoprotetor.

ABSTRACT

The liver is the main organ involved in the process of metabolizing xenobiotics, so any disturbance related to its absorption and/or excretion can lead to a series of injuries, either acute or chronic. Among the causes of acute hepatitis, drug-induced acute liver disease stands out, responsible for a wide spectrum of liver damage, which clinically can present in the most varied forms, ranging from mild headaches and nausea to severe liver failure. Acute in need of transplantation. Considering the high prevalence and severity of liver disease worldwide, and the

lack of pre- and post-clinical alternatives, the search for new substances with protective potential is necessary. *A. aculeata* popularly known as bocaiuva, both the pulp and the chestnut have numerous compounds with biological activities, among which we can mention its anti-inflammatory and antioxidant activity. Thus, the objective of this work was to evaluate the effect of bocaiuva pulp oil (OPB) in the prevention of acute liver injury in mice. For this purpose, 21 animals were divided into three sample groups, one group of animals pre-treated with 50µL of OPB by gavage for seven days, while two control groups received saline solution in the same volume. On the eighth day, the animals received 300 mg/Kg of acetaminophen i.p. The negative control received 0.9% saline i.p. After 24 hours the animals were weighed and euthanized for collection of biological samples. Biometrics and macroscopic evaluation of the livers were performed, in addition to histopathological analyzes and determination of serum levels of the enzyme alanine aminotransferase (ALT) as markers of hepatic necrosis, glycemia and frequency of micronuclei in erythrocytes. The results obtained demonstrate that OPB is within the specifications of the Brazilian legislation for crude oils, with quality parameters of 2.62 g/100g for acid value, 7.29 meqO₂/kg for peroxide value and 86.65 g /100g for iodine value. When analyzing the weight of the animals, a reduction of approximately 10% in weight was observed in all groups. The liver biometry analyzes in the three experimental groups showed significant differences between them, the livers of the non-pretreated control group weighed an average of 0.17g more compared to the group pretreated with OPB. When analyzing the serum levels of ALT, a significant reduction was observed in animals pre-treated with OPB (60U/mL) compared with the non-pretreated control group (130U/mL), indicating a protective effect of OPB. This difference was also evident in the macroscopic and histopathological evaluations, which revealed a reduction in the areas of liver damage in animals pre-treated with OPB, preserving the macroscopic morphology of the organ. , mostly preserving its normal architecture, in the quantitative analysis necrotic areas were observed in the livers of animals pretreated with OPB. There was a reduction in the glycemic level on the eighth day of OPB administration, in the same way an increase in these levels was observed in the non-pretreated negative control group on the eighth day. In the erythrocyte micronucleus test, an average reduction of 15% of micronuclei was observed in the group pretreated with OPB. These findings suggest that bocaiuva pulp oil has promising properties in protecting against acute liver injury, and may represent a valuable therapeutic alternative for the treatment and prevention of these conditions. However, further studies are needed to fully elucidate the mechanisms of action and therapeutic potential of OPB in this context.

Keywords: macaúba oil, non-alcoholic hepatitis, acetaminophen, antitoxic

INTRODUÇÃO

As doenças hepáticas representam um grande desafio tanto na medicina humana quanto veterinária, devido à sua natureza progressiva, à compreensão limitada de sua patogênese e à disponibilidade limitada de estratégias terapêuticas (LI et al., 2017; LLOVET et al., 2021). Estudos têm demonstrado

que as doenças hepáticas estão associadas ao estresse oxidativo, respostas inflamatórias exacerbadas e comprometimento da homeostase do metabolismo energético, os quais podem induzir danos e morte celular (LLOVET et al., 2021). Dentre as causas da hepatite aguda destaca-se a hepatite medicamentosa, acidental ou intencional, responsável por levar a quadros de hepatotoxicidade grave e necrose hepática em seres vivos, especificamente em humanos (KAPLOWITZ, 2005).

Apesar dos avanços significativos na medicina moderna, ainda não existem fármacos completamente eficazes capazes de estimular a função hepática, oferecer proteção completa ao órgão ou auxiliar na regeneração das células hepáticas (GIORDANO et al., 2014). Diante desse cenário, a identificação de novas substâncias ou estratégias para o tratamento das doenças hepáticas torna-se imperativa. Nesse contexto, o uso de compostos de origem vegetal desempenha um papel fundamental na assistência médica.

Plantas com potencial na prevenção ou tratamento das lesões hepáticas têm sido descritas, em particular aquelas com propriedades antioxidantes (LEE et al., 2003). A espécie *A. aculeata* pertence à família Arecaceae, genericamente conhecida como bocaiuva e é rica em constituintes químicos na sua polpa e amêndoas. Alguns estudos já demonstraram que o óleo da polpa de bocaiuva (OPB) é provido de importante atividade anti-inflamatória, sendo capaz de inibir a migração de leucócitos para o foco inflamatório e que essa ação possivelmente é mediada por compostos fenólicos e ácidos graxos, que são capazes de reduzir mediadores inflamatórios como citocinas e óxido nítrico (WIKTOROWSKA-OWCZAREK et al., 2015, VENTRO et al., 2017), bem como a produção de radicais livres por macrófagos (GUIDONI et al., 2019).

Além de seus efeitos anti-inflamatórios, foi demonstrado que o OPB possui efeito antigenotóxico (DA SILVA et al., 2019, COSTA et al., 2020), altas compostos antioxidantes como os carotenoides (SANJINEZ-ARGANDOÑA & CHUBA 2011, COSTA et al., 2020), α-tocoferol (COIMBRA & JORGE 2011, SCHEX et al., 2018). Outros estudos mostraram que o β-caroteno é capaz de suprimir a liberação de citocinas como a IL-1 β , IL-6 e TNF-α pela inibição das vias de sinalização NF-κB, JAK2/STAT3 e JNK/p38 MAPK em macrófagos (LI et al., 2019). Em relação à mutagênese, foi demonstrado que a suplementação com α-tocoferol e β-caroteno pode proteger o DNA contra danos oxidativos, apoiando

a hipótese de que óleos vegetais, ricos nestes antioxidantes, podem ter propriedades antimutagênicas (ANTER et al., 2010).

Dessa maneira o OPB apresenta potencial promissor como óleo vegetal inovador por seu baixo custo, propriedades farmacológicas diversas e propósitos nutricionais versáteis. Portanto esse trabalho teve como objetivo a avaliação do efeito do OPB na prevenção da lesão hepática aguda induzida por xenobióticos em camundongos.

MATERIAL E MÉTODOS

Obtenção e caracterização do óleo da polpa de bocaiuva (OPB)

Os frutos maduros foram coletados na região norte da cidade de Campo Grande/MS, na fazenda estância Catijó, estado de Mato Grosso do Sul, nas coordenadas geográficas 22° 14 'S e 54°55'W, com altitude média de 446 metros.

A extração do óleo da polpa foi realizada utilizando como solvente o hexano e como equipamento, o Soxhlet, que se trata de um extrator de refluxo de solvente, cuja extração é intermitente, evitando a alta temperatura de ebulação do solvente e por consequência evita também sua decomposição (CECCHI, 2003). Para a caracterização e avaliação de qualidade do OPB foi realizada a metodologia oficial da AOCS (*American Oil Chemists' Society*) que incluiu o índice de acidez, índice de peróxido, perfil de ácidos graxos e carotenoides totais (AOCS, 2004). Para este estudo foram analisados os testes de qualidade através do índice de acidez e peróxido e identidade através do índice de iodo.

Animais

Camundongos isogênicos da linhagem C57 Black-6, machos, com oito semanas em média, pesando 18-22g, para separação dos grupos amostrais e ensaios biológicos Os animais foram provenientes do biotério da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, mantidos em condições de temperatura (23-25°C) e o ciclo claro/ escuro controlados, com livre acesso à ração e água. Os

experimentos foram conduzidos de acordo com as normativas do CONCEA e aprovados pela CEUA-UCDB Nº003/2022.

Divisão dos grupos amostrais

Os animais foram divididos aleatoriamente em três grupos, grupo 1 animais grupo controle negativo contendo 5 animais, grupo 2 animais induzidos a lesão hepática aguda e pré tratados com OPB contendo 8 animais e grupo 3 animais induzidos a lesão hepática aguda e não pré tratados (tratados com salina) contendo 8 animais.

Indução da lesão hepática aguda

Foi utilizado no estudo o modelo de lesão hepática aguda induzida por acetaminofeno. Os camundongos foram submetidos a jejum alimentar e hídrico por 16 horas. Após isso os animais receberam intraperitonealmente (*i.p.*) o acetaminofeno 300 mg / kg ou veículo (PBS 1X). O acetaminofeno foi diluído em PBS 1X, aquecido a 60°C até completa solubilização e resfriado lentamente a 30-37°C para administração aos animais. O livre acesso à água e alimentos foi imediatamente restabelecido após os tratamentos. Após 24 horas os animais foram eutanasiados para coleta das amostras biológicas (SOUZA et al., 2021).

Avaliação do efeito do OPB na prevenção da lesão hepática aguda

Os 21 camundongos utilizados para esse ensaio receberam 50µL de OPB por gavagem por 7 dias consecutivos, respeitando o mesmo horário de aplicação. No 8º dia os camundongos foram submetidos ao protocolo de lesão hepática aguda e após 24 horas foram eutanasiados a as amostras biológicas coletadas para análise. Os animais controles receberam 50µL de solução salina no mesmo período e horário.

Coleta de amostras biológicas

As coletas das amostras biológicas foram realizadas 24 horas após as induções das lesões hepáticas agudas em seus respectivos grupos. Para isso os camundongos foram pesados e anestesiados com xilazina 7,5mg / Kg e cetamina 150 mg / Kg via intraperitoneal, a coleta de sangue foi realizada pelo método de punção cardíaca em seringa heparinizada. O sangue foi centrifugado por 10 min a 1500 RPM, e o soro reservado para posterior análise bioquímica. Os fígados foram retirados, pesados e fotografados, os fragmentos foram parte fixados em formalina tamponada com fosfato a 10% e parte congelados em nitrogênio líquido com armazenamento a -80 °C.

Determinação do impacto da prevenção com OPB sobre o peso dos animais

Para a determinação do peso, os camundongos foram pesados individualmente no primeiro e no oitavo dia do experimento, utilizando uma balança de precisão modelo Bel S2202H.

Determinação do impacto do OPB sobre o peso e dimensão do fígado de animais submetidos a lesão hepática induzida por acetaminofeno.

Após o término do período experimental e posterior coleta do material biológico, os fígados dos animais foram colhidos, pesados (peso fígado) e fotografados para análise macroscópica. O peso relativo do fígado foi calculado através da fórmula: "Peso relativo (%) = "Peso do fígado (g)" /" Peso corpóreo (g)x100". Fragmentos de fígado foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C. Outros fragmentos foram fixados em solução de formol 10%, durante 24 horas, posteriormente trocados para álcool 96 % e processados histologicamente.

Análises séricas da alanina aminotransferase (ALT)

Para a realização das análises séricas foi utilizado o soro dos camundongos, realizou-se a dosagem de alanina aminotransferase (ALT), por método enzimático colorimétrico com o uso de kits comerciais (BioClin, Brasil)

em um analisador automático (Chemistry Analyzer BS-200, Mindray Medical International Limited, China).

Análises Biológicas para Determinação do impacto do OPB sobre a arquitetura e função renal

Biometria, e avaliação macroscópica do fígado

Após o término do período experimental e posterior coleta do material biológico, os fígados dos animais foram colhidos, pesados (peso fígado), mensurados (dimensão) e fotografados para análise macroscópica. O peso relativo do fígado foi calculado através da fórmula:

$$\text{Peso relativo (\%)} = \text{Peso do fígado (g)} / \text{Peso corpóreo (g)} \times 100$$

Fragmentos de fígado foram rapidamente congelados em nitrogênio líquido e armazenados em freezer -80°C.

Avaliação histopatológica e quantificação da lesão hepática

Para essa etapa, após a eutanásia, o fígado foi removido, lavado em solução fisiológica (NaCl 0,9%), Em seguida, amostras representativas dos lobos lateral esquerdo, medial direito e caudado foram fixadas em formol 10% por 24horas e, depois, transferidas para álcool 95% e rotineiramente processadas e incluídas em parafina. Foram obtidos cortes histológicos com 5 µm de espessura para coloração em Hematoxilina e Eosina (HE).

As áreas de necrose produzidas pela administração do acetaminofeno foram fotografadas em aumento de 100x (objetiva de 10x) pela câmera Leica ICC50W acoplada ao microscópio LEICA DM 750. Foram obtidas aleatoriamente 5 imagens de cada amostra de fígado, a análise morfométrica foi realizada com auxílio do sistema de análise de imagem computadorizado Image Pro-Plus (Media Cybernetics Inc), versão 4.5. O limite de cada área necrótica foi determinado manualmente e o valor numérico indicado pelo sistema. A área total de cada imagem também foi mensurada. Estas áreas foram separadamente

somadas por animal para cálculo da porcentagem de área lesada em relação à área total analisada.

Análise da glicemia

A glicemia dos camundongos foi aferida no 1º e no 9º dia de experimentação. Para a aferição de glicose no 1º dia foi coletada uma gota de sangue da cauda dos animais, preferencialmente no mesmo horário, em capela de fluxo laminar, a gota de sangue foi colocada em fitas ACCU-Check Active (Roche, Basileia, Suíça), e inseridas no medidor ACCU-Check Active (Roche) para leitura. Os dados foram coletados e anotados para análises posteriores. Para a aferição de glicose no 9º dia uma gota de sangue da seringa em que foi coletado o sangue por punção intracardíaca foi colocada em fitas ACCU-Check Active (Roche, Basileia, Suíça), e inseridas no medidor ACCU-Check Active (Roche) para leitura. Os dados foram coletados e anotados para análises posteriores.

Teste do micronúcleo em eritrócitos

Os micronúcleos foram analisados a partir dos eritrócitos do sangue de camundongos coletados por punção intracardíaca. Duas lâminas foram preparadas desenhando uma gota de sangue sobre a lâmina para formar um esfregaço fino, que foi seco ao ar por 24 h, fixado em metanol por 10 min e corado por 40 min com corante Giemsa a 5% (p/v). De acordo com Ribeiro et al (2003), a coloração serve para diferenciar eritrócito policromático (PCE) de eritrócito normocromático (NCE). Eritrócitos policromáticos (PCE) ou jovens se coram de azul claro e eritrócitos normocromáticos se coram de vermelho-telha. Com os ajustes necessários concluídos, em cada lâmina, verificou-se a presença de micronúcleo e de alterações morfológicas nucleares em 2.000 eritrócitos por lâmina (Nikon® Eclipse 80i, lente de imersão em óleo, 100/1,25). Para a pontuação de micronúcleos, os critérios de Al-Sabti & Metcalfe (1995) foram adotados. Foi anotado o número de micronúcleos e de alterações morfológicas nucleares por lâmina, para análise estatística.

Análise Estatística

O teste de análise de variância (ANOVA) foi utilizado para comparar as diferenças entre as análises. Em todos os casos, comparações individuais foram realizadas por meio do pós-teste de Bonferroni (comparações múltiplas). Os resultados foram expressos como média \pm EPM e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas para $p<0,05$.

RESULTADOS

Caracterização físico-química do OPB.

No teste de qualidade e identidade foram analisados os índices de acidez os índices de peróxido e os índices de iodo, os quais são descritos como parâmetros de qualidade em óleos vegetais (ANVISA, 2021). Como resultados obtivemos a média dos índices de acidez de 2,62%, índices de peróxidos 7,29 meqO₂ / kg e índices de iodo 86,65g/100g, conforme a tabela 1, todos os índices se mostraram dentro dos padrões aceitáveis para óleos brutos (ANVISA, 2021).

Tabela 1 Parâmetros de qualidade e identidade do OPB.

Índice	Valores¹
Índice de acidez (em ácido oleico g/100g)	2,62 \pm 0,18
Índice de peróxidos (meq/kg)	7,29 \pm 0,46
Índice de iodo (g/100g)	86,65 \pm 4,17

¹Os valores são expressos como média \pm EPM ou DP.

Determinação do impacto da prevenção com OPB sobre o peso dos animais

Para a determinação do peso, os camundongos foram pesados individualmente no primeiro e no oitavo dia do experimento, utilizando uma balança de precisão Bel S2202H. Os resultados revelaram uma perda de peso de aproximadamente 10% em todos os grupos experimentais no oitavo dia, em

comparação com o primeiro dia de avaliação. No entanto, não foram observadas diferenças entre os grupos no oitavo dia (Figura 1).

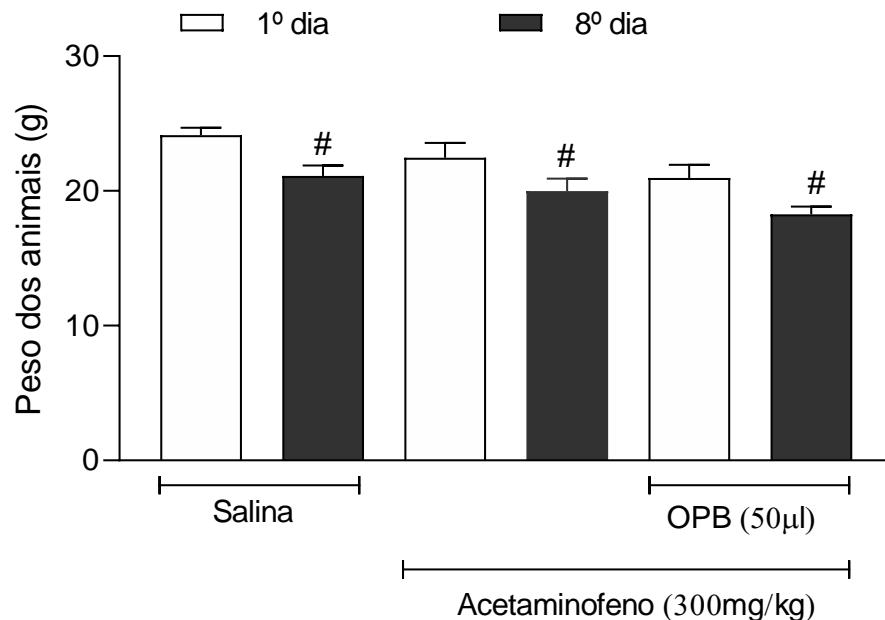


Figura 1: Efeito do OPB no peso dos camundongos. O efeito hepatoprotector do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ L/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Os controles negativos receberam salina 0,9% (50 μ L i.p.). Os animais foram pesados no primeiro e oitavo dia do experimento. Os resultados estão expressos em gramas (g) (media \pm EPM) # $p<0,05$ quando comparado ao grupo salina (controle negativo). ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.

Determinação do impacto do OPB sobre o peso e dimensão do fígado de animais submetidos a lesão hepática induzida por acetaminofeno.

Foram realizadas avaliações das dimensões (mm) e peso (g) dos fígados dos animais submetidos à lesão hepática induzida por acetaminofeno, com e sem tratamento com o OPB. Os fígados foram pesados individualmente e as medições de dimensões foram feitas com um paquímetro digital de aço inoxidável. Para isso, traçou-se uma linha horizontal conectando os pontos de uma extremidade à outra do fígado. Os resultados obtidos revelaram um aumento significativo no peso e nas dimensões dos fígados nos animais

submetidos à lesão hepática sem tratamento em comparação com os animais tratados com o OPB ou aqueles sem lesão hepática (Figura 2, painel A e painel B).

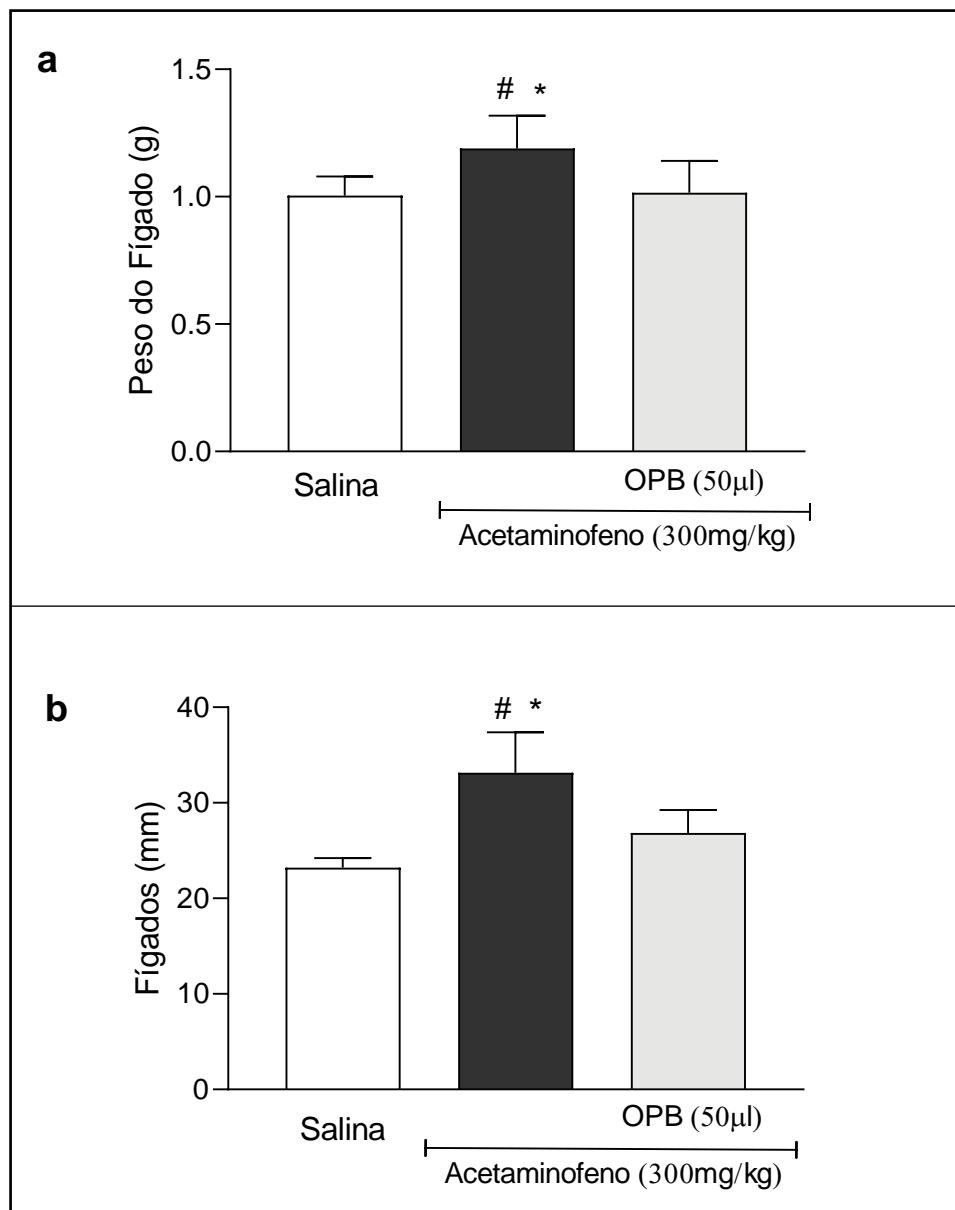


Figura 2: Efeito do OPB no peso e dimensão do fígado de camundongos. O efeito hepatoprotetor do OBP foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ L/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Os controles negativos receberam salina 0,9% (50 μ L i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados os fígados foram retirados pesados (figura a) e mensurados (figura b). Os resultados estão expressos em gramas e milímetro (mm) (media \pm EPM) # $p<0,05$ quando comparado ao grupo salina (controle negativo). * $<0,05$ quando comparado ao grupo com lesão e não tratados. ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni

Determinação do impacto do OPB sobre as análises séricas (ALT)

Como marcador da lesão hepática foram avaliados os níveis séricos de ALT no soro dos camundongos submetidos a lesão hepática por acetaminofeno, tratados ou não com OPB. Foi observado que o OPB foi capaz de reduzir os níveis de ALT (média 60U/mL) quando comparados com o grupo não tratado e controle negativo (média de 130U/mL), afirmando ainda a eficácia do modelo de indução de lesão hepática aguda com acetaminofeno realizada no grupo não tratado. (Figura 3).

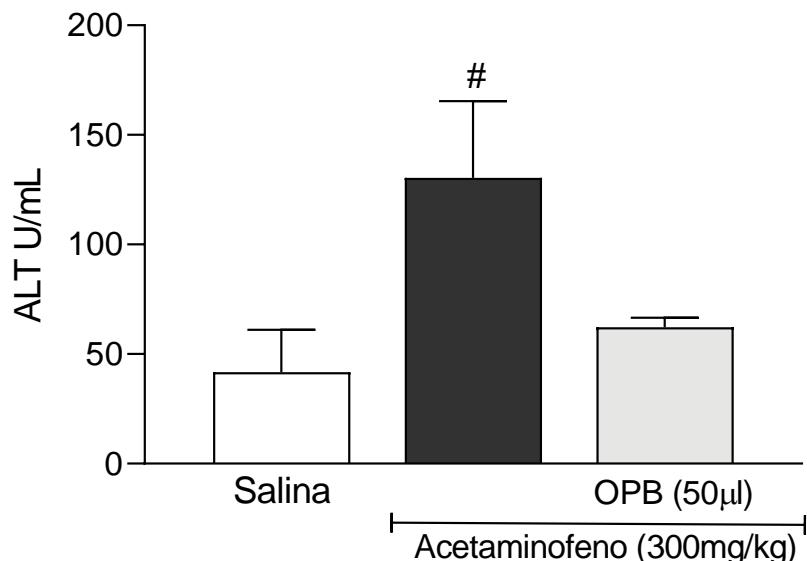


Figura 3: Efeito do OPB nos níveis séricos de ALT na lesão hepática em camundongos. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ L/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Os controles negativos receberam salina 0,9% (50 μ L i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e quantificados os níveis séricos da alanina aminotransferase (ALT). Os resultados estão expressos em U/dL (media \pm EPM) # $p<0,05$ quando comparado ao grupo salina (controle negativo). ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.

Determinação do impacto da prevenção com OPB sobre a arquitetura hepática

Para avaliar o efeito do OPB sobre a morfologia do fígado foi realizada a análise macroscópica (Figura 4). Os resultados demonstram que os animais submetidos a lesão hepática e não tratados com OPB apresentaram aspecto difusamente pálido, com áreas hemorrágicas (e) ictéricas, com evidenciação do padrão lobular, bordos levemente arredondados (Figura 4, painéis E e F). Por outro lado, no fígado dos animais tratados com OPB foram observados discreta evidenciação do padrão lobular, sem regiões ictéricas ou hemorrágicas (Figura 4, painéis A, B, C e D).

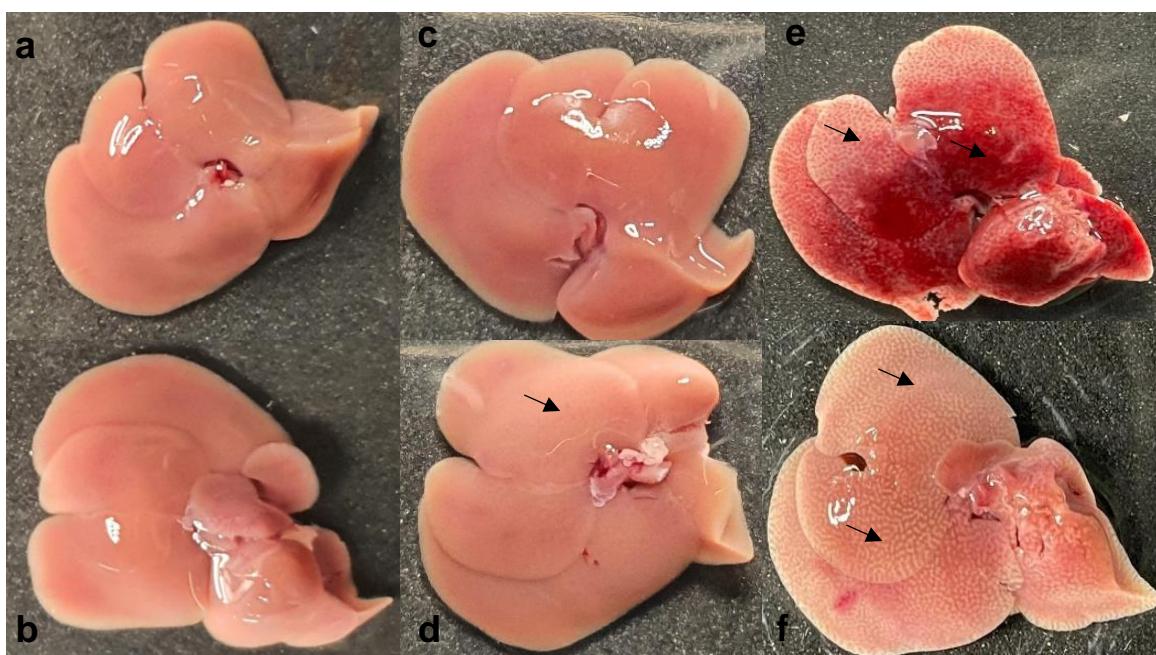


Figura 4: Efeito do OPB na arquitetura hepática. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB ($50\mu\text{L}$ /gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg , i.p.). Os controles negativos receberam salina 0,9% ($50\mu\text{L}$ i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e os fígados foram retirados para análise macroscópica. As fotos foram capturadas com câmera Canon. As setas representam: figura d: discreta evidenciação do padrão lobular; figura e: regiões hemorrágicas; figura f: áreas ictéricas com evidenciação do padrão lobular.

Determinação do impacto da prevenção com OPB sobre microscopia hepática, análise histopatológica e quantificação da lesão

A análise dos efeitos do OPB na prevenção da lesão hepática induzida pelo acetaminofeno foi realizada também por meio quantificação das áreas de

necrose. Na figura 5 demonstra cortes histológicos do fígado dos animais dos três grupos: controle negativo (a), lesão pré tratados com OPB (b) e lesão não tratados (c). Observa-se evidente diferença entre a figura 5 a quando comparado às figuras 5 b e 5 c. O grupo controle negativo apresenta a arquitetura de um tecido saudável sem alterações no parênquima e hepatócitos, com formato poliédrico representando tecido normal. Por outro lado, o tecido hepático dos lesão não tratados (c) apresentaram áreas de necrose. porém observa-se que a figura (b) manteve mais áreas com tecido íntegro, com morfologia e núcleos preservados, já na figura (c) a morte maciça de hepatócitos ao redor da veia centro lobular é mais evidente, formando extensas manchas necróticas, as quais, na coloração em HE estão identificadas pela coloração rosa. As áreas necróticas encontradas no grupo lesão não pré tratados foram evidenciadas na figura 6, aonde aleatoriamente dois fígados foram escolhidos para representar através do software Image J a evidenciação da área necrótica, representada pela coloração branca.

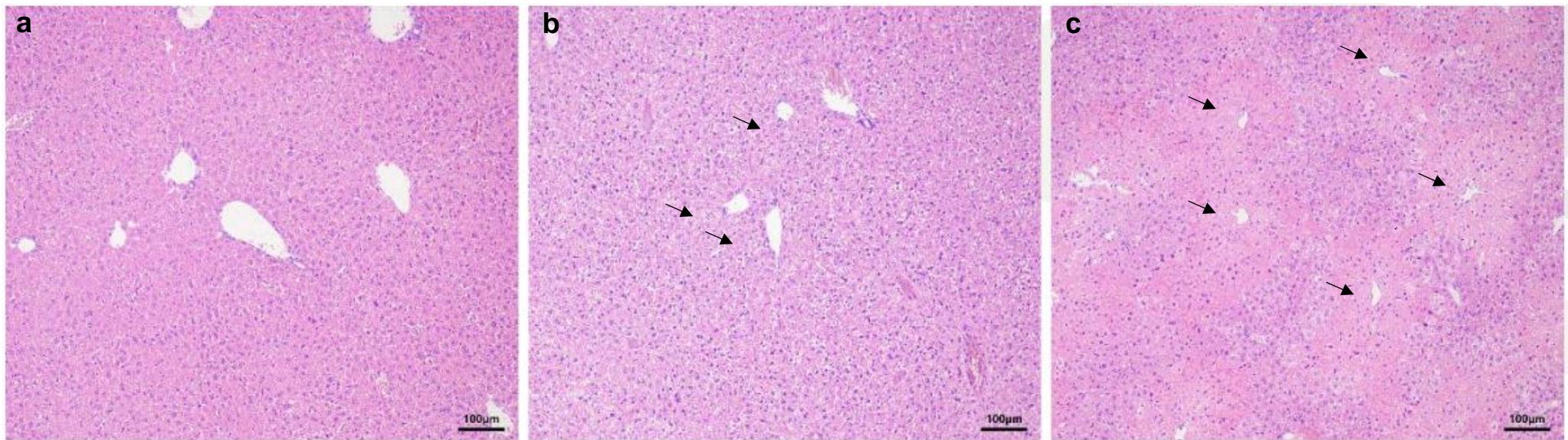


Figura 5: Efeito do OPB na microscopia hepática. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ l/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e porções dos fígados foram preparadas para análise histológica; a- grupo controle negativo, morfologia normal do tecido hepático; b- grupo lesão hepática + pré tratamento com OPB, desorganização trabecular difusa com vacuolização citoplasmática moderada dos hepatócitos (setas) com arquitetura hepática preservada; c- grupo lesão hepática não pré tratados, acentuada necrose hepática centrolobular com pontes centro-centrais (setas). (HE, 100x, barra 100 μ m).

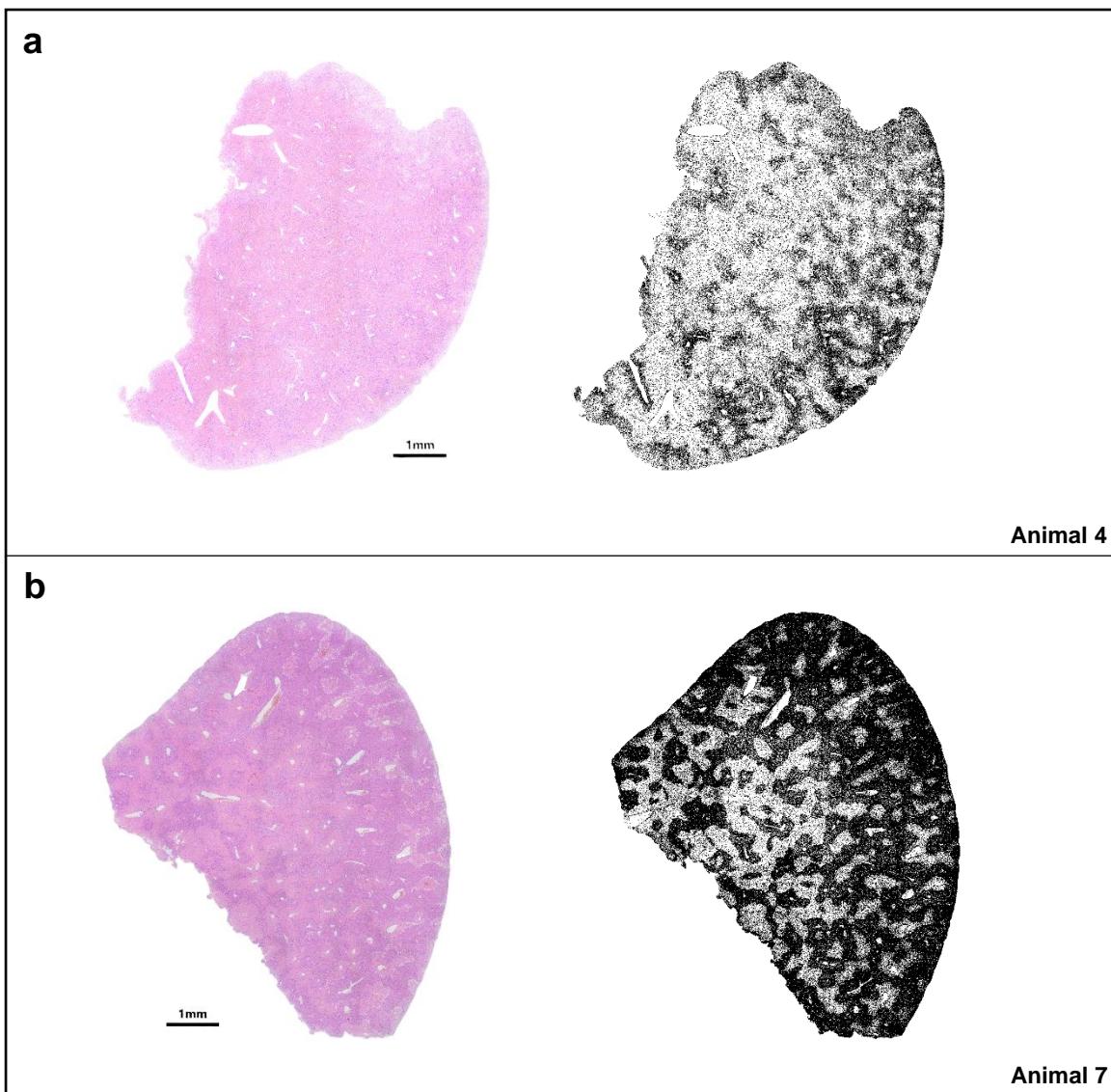


Figura 6: Efeito do OPB na fotomicrografia hepática. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ l/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e porções dos fígados foram preparadas para análise histológica; a e b- grupo lesão sem pré tratamento, necrose hepática difusa evidenciada nas áreas brancas das imagens à direita avaliadas por meio do software Image J.

Para quantificar a lesão hepática observada nas análises histológicas, foram realizadas as comparações entre as áreas lesadas dos grupos lesão tratado com OPB e lesão não tratados (Figura 7). Estas áreas foram separadamente somadas por animal para cálculo da porcentagem de área lesada em relação à área total analisada. Os dados demonstram que houve diferença significativa quando comparados os grupos, tratados ou não com OPB.

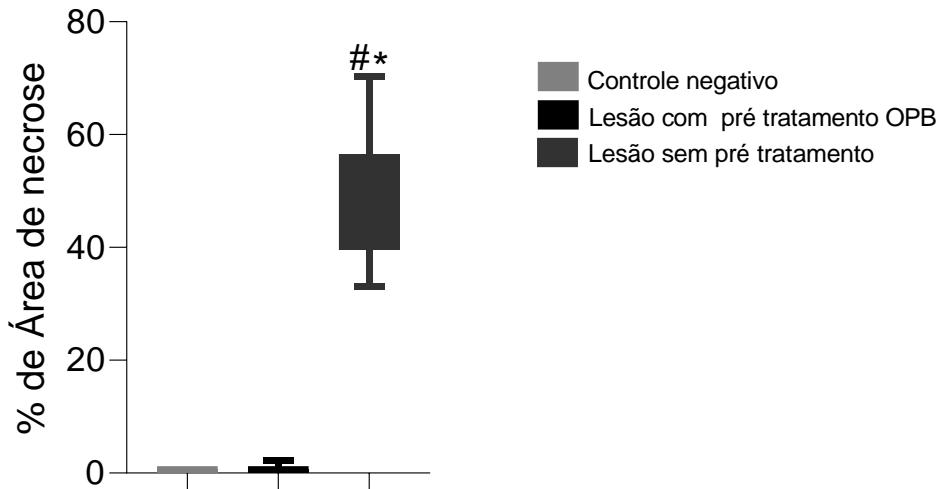


FIGURA 7: Efeito do OPB na quantificação da lesão hepática. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ l/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). Após 24 horas os animais foram eutanasiados e porções dos fígados foram preparadas para análise histológica. Os resultados estão expressos em porcentagem de área de necrose (media \pm EPM) # $p<0,05$ quando comparado ao grupo salina (controle negativo). * $p<0,05$ quando comparado ao grupo com lesão e não pré tratados. ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.

Determinação do impacto do OPB sobre a glicemia

A concentração de glicose na circulação sanguínea aumentou significativamente ($P \leq 0,05$) nos animais que receberam pré tratamento com OPB comparados ao grupo lesão não pré tratados com OPB, que não ultrapassou a média de 90mg/dL no 8º dia de tratamento.

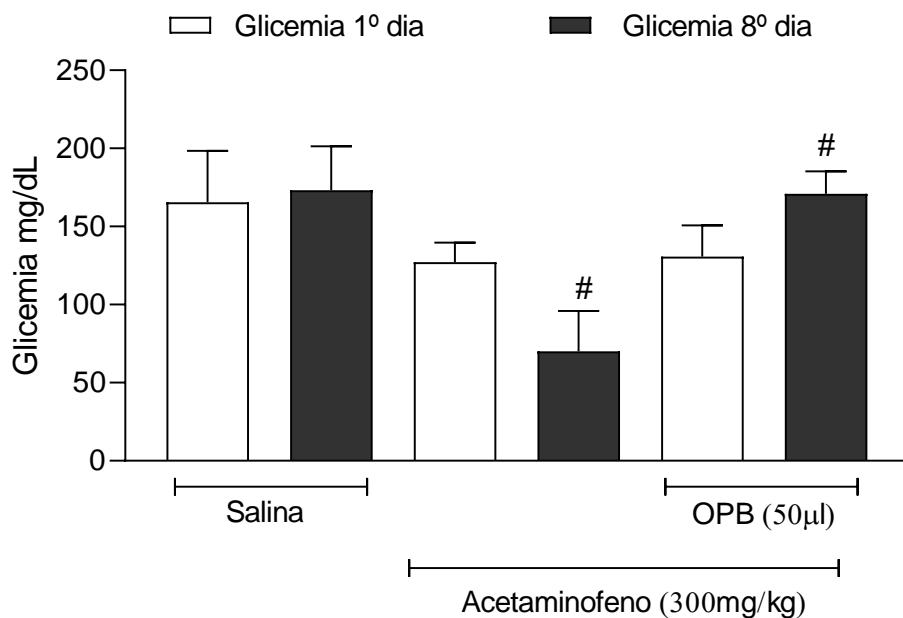


FIGURA 8: Efeito do OPB na glicemia dos animais. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ l/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). A glicemia dos animais foi mensurada no primeiro e oitavo dia do experimento. Os resultados estão expressos em miligramas por decilitro (mg/dL) (media \pm EPM) # $p<0,05$ quando comparado ao grupo salina (controle negativo). ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.

Determinação do impacto do OPB teste de micronúcleo

O teste de micronúcleo (MN) rotineiramente é realizado para se obter parâmetro de toxicidade de um composto, pois ele permite a identificação do aumento da frequência de mutações em células que são expostas a uma quantidade variada de agentes genotóxicos. Nossos resultados apontam que os animais submetidos a lesão hepática não tratados com o OPB apresentaram aumento no número de hemácias policromáticas em relação aos animais pré tratados e grupo controle negativo (Figura 9, painel a). Por outro lado, quando foi avaliada frequência de eritrócitos micronucleados, os animais com lesão hepática não pré tratados com o OPB apresentam número de micronúcleos menor em relação aos animais que receberam o óleo e o grupo controle negativo (Figura 9, painel b).

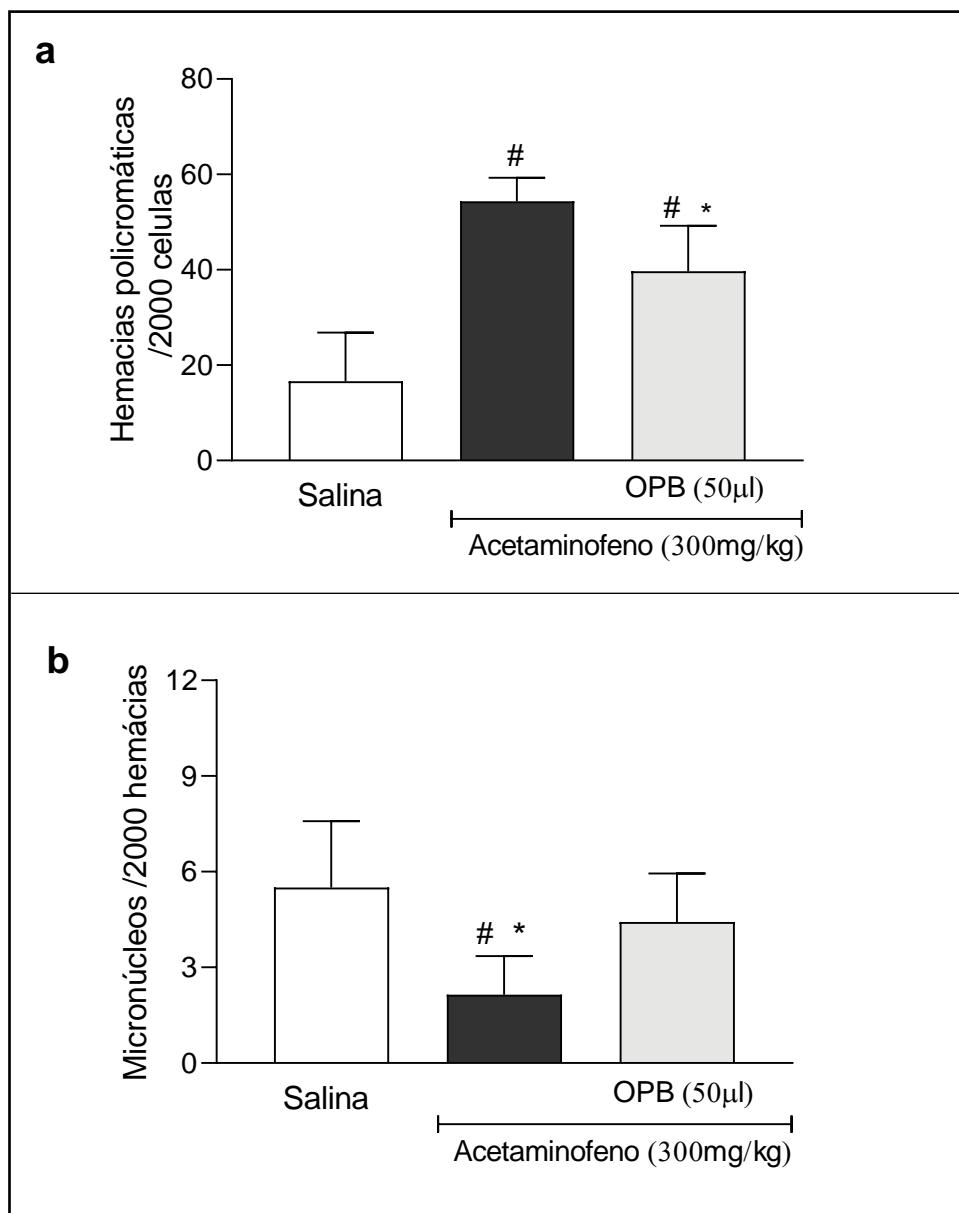


FIGURA 9: Efeito do OPB no teste de micronúcleo. O efeito hepatoprotetor do OPB foi avaliado em camundongos C57BL-6 ($n=8$) submetidos ao pré-tratamento com OPB (50 μ l/gavagem) por 7 dias antes da lesão induzida por acetaminofeno (300mg/kg, i.p.). O teste de micronúcleo foi analisado a partir de lâminas confeccionadas com uma gota de sangue periférico dos camundongos. Os resultados estão expressos em gramas e milímetro (mm) (media \pm EPM) # $p<0,05$ quando comparado ao grupo salina (controle negativo). * $<0,05$ quando comparado ao grupo com lesão e não pré tratados. ANOVA seguida de pós teste de Bonferroni.

DISCUSSÃO

Este estudo teve como objetivo avaliar o potencial benefício da utilização no OPB na prevenção da lesão hepática aguda induzida por acetaminofeno em camundongos, para isso o primeiro passo do trabalho foi a confecção e análises físico-químicas do OPB.

No Brasil, o MAPA fiscaliza as regras e o comércio de óleos vegetais brutos e refinados para consumo humano (MAPA, 2006; MAPA, 2021), porém o óleo bruto da polpa de bocaiuva ainda não tem padrões estabelecidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), no entanto seu padrão se assemelha aos padrões internacionais descritos pelas Normas do Codex Alimentarius para gorduras e óleos de fontes vegetais (CODEX ALIMENTARIUS, 1999; ANVISA, 1999).

As análises físico-químicas são aquelas que fornecem informações sobre as propriedades químicas ou físicas dos constituintes de uma amostra ou sobre a própria amostra. As técnicas instrumentais, baseadas em determinados princípios físicos e químicos desempenham importante papel avaliador da qualidade e segurança dos alimentos (FAO, 2019; CECCHI, 2003). O índice de acidez é um valor que revela a quantidade de ácidos graxos livre advindos dos processos de hidrólise dos triacilgliceróis, um elevado índice de acidez pode indicar que o óleo está sofrendo quebras nas cadeias de triglicerídos, liberando seus constituintes principais, e por esse motivo, o cálculo desse índice é de extrema importância na avaliação do estado de deterioração (rancidez hidrolítica) do óleo (SANTOS, 2010). Os valores obtidos neste trabalho para o óleo bruto atendem as especificações da legislação brasileira para óleos brutos e pode ser comparado com outros óleos brutos comestíveis, seu índice de acidez (2,62%) se encontra inferior ao limite regulamentar de 4% (ANVISA, 2021; FAO, 2019), isso indica que os frutos da bocaiuva, utilizados para a obtenção do OPB, estavam no ponto correto de maturação, bem como seu adequado armazenamento. O índice de peróxidos (IP) (7,29 meqO₂ / kg) apresentou abaixo do limite recomendado para óleos, que seria de 15 meqO₂ / kg para óleos brutos e 10 meqO₂ / kg para óleos refinados (LIMA & GONÇALVES, 1994; RAMESH, 1995, FAO, 2019; ANVISA, 2021), assim viabilizando seu uso para nosso estudo. A elevação do índice de peróxido demonstra o aumento da oxidação térmica e lipídica, formando hidroperóxidos que

podem comprometer o aroma, cor e sabor dos óleos, culminando no processo de rancificação do óleo (SILVA et al., 2018), os valores encontrados nesta pesquisa indicam baixa possibilidade de deterioração oxidativa, confirmando a qualidade dos mesmos e a eficácia do tempo e temperatura empregados no processo produtivo e o adequado armazenamento do óleo.

O índice de peróxidos (IP) (7,29 meqO₂ / kg) apresentou abaixo do limite recomendado para óleos, que seria de 15 meqO₂ / kg para óleos brutos e 10 meqO₂/kg para óleos refinados (LIMA & GONÇALVES, 1994; RAMESH, 1995, FAO, 2019; ANVISA, 2021), assim viabilizando seu uso para nosso estudo. A elevação do índice de peróxido demonstra o aumento da oxidação térmica e lipídica, formando hidroperóxidos que podem comprometer o aroma, cor e sabor dos óleos, culminando no processo de rancificação do óleo (SILVA et al., 2018), os valores encontrados nesta pesquisa indicam baixa possibilidade de deterioração oxidativa, confirmando a qualidade dos mesmos e a eficácia do tempo e temperatura empregados no processo produtivo e o adequado armazenamento do óleo. O índice de iodo de um óleo correlaciona-se com o grau de insaturação dos ácidos graxos constituintes, sendo definido como a quantidade, em gramas de iodo, que são adicionados em 100 g de amostra (RIBEIRO, 2007), o índice de iodo do OPB (86,65g/100g) se encontrou dentro dos parâmetros aceitáveis, uma vez que comparando esse índice com os índices do azeite de oliva (75 a 94 g/100g), seus valorem se encontram abaixo do máximo permitido dentro da norma *Codex Alimentarius* (FAO, 2019), segundo Cecchi (2003), quanto maior a insaturação dos óleos, consequentemente maior será o índice de iodo e maior será também a possibilidade de rancidez por oxidação, esta determinação é relevante não só para a classificação de óleos e gorduras, mas também para alguns tipos de processamento.

Desta forma podemos considerar que o óleo extraído a partir da polpa de bocaiuva apresentou resultados para as propriedades físico-químicas dentro dos padrões recomendados pelos órgãos de identidade e qualidade de óleos vegetais.

De modo geral foi possível observar uma tendência de modificação do peso corpóreo dos animais no 1º e no 8º dia, em média redução de 10% do peso corpóreo em cada grupo, porém sem diferença significativa entre os grupos. A perda de peso pode ser explicada pela manipulação diária e a troca de ração que esses animais sofreram, submetendo-os a situação de estresse, de acordo com

Jeong et al (2013) a perda de peso é um indicador de estresse em modelos animais (ratos e camundongos). Neste caso, percebe-se que a administração do paracetamol e a introdução do pré tratamento com OPB não exerceu efeito diferencial no peso dos animais.

O modelo experimental utilizado em nosso estudo para verificar a atividade hepatoprotetora do OPB é bastante efetivo e tem sido utilizado com a mesma finalidade para o estudo de diversos extratos vegetais como o de *Trichosanthes lobata* (RAJASEKARAN & PERIYASAMY, 2012), de *Cyathea gigantea* (KIRAN et al., 2012), de *Cnidoscolus aconitifolius* (OYAGBEMI & ODETOLA, 2010), de *Clitoria ternatea* (NITHIANANTHAM et al., 2011), de 6-Gingerol (SABINA et al., 2011) e de *Polyalthia longifolia* e *Cassia spectabilis* (JOTHY et al., 2012). Em todos estes trabalhos citados foi realizado um período de pré-tratamento, sendo o mais frequente de sete dias e o período pós-administração da indução da lesão hepática com paracetamol até a eutanásia dos animais foi de 24h, corroborando com o protocolo seguido em nossa pesquisa.

Em relação ao peso dos fígados e suas dimensões foi observado uma diferença significativa no grupo lesão não pré tratados, aonde nota-se aumento tanto no peso quanto no tamanho desse órgão corroborando com Elgarawany et al (2019), aonde induziu lesão hepática em camundongos com 300 mg/kg de acetaminofeno, e foi observado alteração no tamanho e peso dos órgãos (0,6 g de aumento) para o grupo não tratado em comparação ao grupo tratado com extrato de silimarina, o que foi explicado pela overdose de acetaminofeno a qual induziu toxicidade hepática e degeneração hidrópica e necrose difusa, portanto, esperava-se que causasse um aumento no peso do fígado, Yaha et al (2013) e Mahmood et al (2014) também observaram em seu estudo aumento do fígado de ratos induzidos a hepatite aguda por acetaminofeno (3g/kg) o que foi relacionado com acúmulo de proteína da matriz extracelular e colágeno no tecido hepático.

A ALT é uma enzima citoplasmática que pode facilmente extravasar para o sangue após a ruptura da membrana dos hepatócitos, tornando-a um biomarcador mais sensível e específico de lesão hepática (SABIU et al., 2015; SALWE et al., 2017), nas diversas ocasiões de dano celular ela é liberada na corrente circulatória (TIMBRELL, 2008), portanto com o aumento significativo dessa enzima podemos sugerir dano celular, necrose e degeneração hepática. A lesão hepática induzida por acetaminofeno é bem estabelecida na literatura, variando

muito entre concentração do medicamento utilizado, tempo de análise da lesão e níveis séricos observados, porem para o modelo estabelecido nesse estudo o esperado é que os níveis séricos de ALT se elevem no sangue de animais induzidos a lesão, principalmente devido a alterações na permeabilidade da membrana das células hepáticas (GIANNINI et al., 2005; VARGAS-MENDOZA et al., 2014). Vários pesquisadores relataram elevações em enzimas hepáticas séricas (ALT e AST) após a administração de doses tóxicas de acetaminofeno em ratos e camundongos (RANDLE et al., 2008; DAS et al., 2011; ZHAO et al., 2011; KISAOGLU et al., 2014; UYSAL et al., 2016; PAUL et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Como observado nesse estudo os níveis de ALT do grupo lesão não pré tratados com níveis próximos a 130U/mL, conseguiram representar os danos hepáticos causados pelo acetaminofeno, por sua vez o grupo lesão pré tratado com OPB apresentou níveis não superiores a 60U/mL. Similarmente aos dados descritos acima, a *Melia azedarach* L., conhecida como cinamomo, utilizada para o tratamento da hanseníase e processos inflamatórios, foi objeto de estudo de Ahmed e colaboradores (2011), o seu extrato metanólico (500 mg/kg v.o) administrado em ratos durante sete dias, seguida da administração de paracetamol no quinto dia apresentou atividade hepatoprotetora, reduzindo os níveis de AST, ALT e fosfatase alcalina. Vários estudos demonstram que a silimarina reduziu os níveis de AST e ALT em modelos de lesão hepática com acetaminofeno (HAU et al., 2010; DAS et al., 2011; EESHA et al., 2011; GALAL et al., 2012; TSAI et al., 2015; NI & WANG, 2016; GHOSH et al., 2016; BEKTUR et al., 2016; SILVA et al., 2017; WANG et al., 2018). De acordo com Xu et al (2021) a linhagem de camundongos C57 black possui ALT entre 50 e 70 U/mL, elevação nos níveis de ALT sugere a instalação de hepatite aguda, entretanto elevações menos expressivas podem estar relacionadas à doença hepatocelular crônica, cirrose, neoplasia ou hepatopatia por parasitas (TENNANT, 1997). Desta forma podemos afirmar que neste estudo o pré tratamento com OPB resultou em atividade hepatoprotetora contra danos frente a hepatite aguda induzida por acetaminofeno.

Para avaliar o efeito do OPB sobre a macroscopia hepática (imagens macroscópicas) após a retirada dos fígados eles foram lavados com solução salina e fotografados, a análise macroscópica revelou que a indução da hepatite aguda (acetaminofeno 300mg/kg) levou a lesão grave do tecido hepático no grupo não pré tratados, enquanto os animais do grupo controle negativo e os animais pré tratados

com OPB não apresentaram evidências de hepatotoxicidade na análise macroscópica do órgão.

Holt et al (2008) também observaram em seus estudos que a administração i.p. de acetaminofeno (400 mg/kg) resultou no desenvolvimento de hepatotoxicidade camundongos C57/BL6. Tanto a avaliação macroscópica como a histológica dos fígados demonstraram que a indução da lesão hepática com acetaminofeno levou a danos hepáticos graves, quando em comparação com camundongos do grupo controle negativo e grupo pré tratados com OPB. De acordo com o trabalho de Bauer et al (2000), a administração de acetaminofeno (300mg/kg) em camundongos causou uma notável congestão das células do fígado, com icterícia difusa, características que conseguimos notar em nosso estudo, evidenciando a eficácia do modelo e acima de tudo conseguindo observar uma melhora expressiva no aspecto macroscópico do fígado de animais pré tratados com OPB, no qual apresentaram apenas discreta evidenciação do seu padrão lobular, sem alterações graves.

As alterações histopatológicas na histoarquitetura do fígado forneceram informações substanciais suporte para os resultados descritos anteriormente. O desarranjo representativo na arquitetura do fígado foi observado nos grupos induzidos a lesão hepática aguda, com significativa melhora em animais tratados com OPB. A morte de hepatócitos e outros tipos celulares hepáticos é uma das características das doenças hepáticas e já é bem estabelecido que as lesões hepáticas induzidas por fármacos desencadeiam grandes áreas de necrose tecidual (MALHI et al., 2006). De acordo com a análise histopatológica, o OPB atuou protegendo o fígado de uma lesão ainda maior, o parênquima hepático de modo geral apresentava-se preservado morfológicamente. Os camundongos expostos ao acetaminofeno (300mg/kg) demonstraram uma extensa área de necrose e o pré tratamento com OPB melhorou a aparência do parênquima hepático, e não houve observação de áreas de necrose. Estudos realizados por Sant'Ana et al (2023), relatam a presença de ácido oleico no óleo da polpa da bocaiuva, descrevendo a atividade protetora ao sistema cardiovascular, reduzindo colesterol livre o que impacta diretamente na atividade hepática. Sabe-se também que ácido oleico atua na atividade antioxidante, anti-inflamatória (bloqueando o complexo NF- κ B por meio da ativação de genes responsáveis pela proteína IL-10) (NI et al., 2015), e no estresse oxidativo (inibição de vias lipogênicas)

(HERNÁNDEZ-RODAS et al., 2017; SANT'ANA et al., 2023), esses fatores podem ser fortes indicadores da ação hepatoprotetora do OPB observadas em nosso trabalho.

A glicemia dos camundongos foi mensurada no primeiro e oitavo dia de experimento, notou-se uma redução significativa da glicemia dos animais do grupo lesão não pré tratados em relação ao grupo lesão pré tratados com OPB no 8º dia de tratamento. Ainda não foram observadas correlações de hipoglicemia em modelos animais utilizando acetaminofeno, justificando mais estudos sobre esse indicador. De acordo com Caraceni (1995) a hepatite aguda em humanos pode evoluir de sintomas inespecíficos como náuseas, vômitos e desconforto abdominal para quadros de confusão mental, sangramento no trato digestório e hipoglicemia. Record et al (1975) relataram que aproximadamente 45% dos indivíduos acometidos com insuficiência hepática aguda cursam com quadros de hipoglicemia em função da depleção dos estoques de glicogênio nos hepatócitos e também pela redução da capacidade de gliconeogênese, o que poderia explicar a hipoglicemia observada no grupo lesão não pré tratados.

O teste do micronúcleo de eritrócitos foi realizado com o objetivo de detectar a alteração genotóxica das células, por se tratar de um teste que avalia a estrutura de fragmentos do material genético proveniente do núcleo principal, esta reação é decorrente da ação de agentes físicos, químicos ou biológicos sobre o material genético (JÚNIOR, 2011; RAMSDORF, 2011). Fenech (2007) classifica o teste de micronúcleos como um dos testes mais utilizados e aplicáveis para avaliar a genotoxicidade de um xenobiótico *in vivo*, apresentando alta sensibilidade como indicador de danos cromossômicos, na análise de material genético retirado de tecidos hematopoiéticos e epiteliais de muitos organismos teste.

De acordo com Cammerer et al (2006) o teste do micronúcleo em medula óssea de roedores é de grande aceitação devido à sua aproximação com seres humanos, visto que evolutivamente são organismos correlacionados. Em nosso estudo conseguimos observar que uma diminuição significativa de micronúcleos de hemácias policromáticas no grupo lesão pré tratados com OPB (redução média de 15%) sugerindo que o pré tratamento com OPB pode atuar na prevenção do dano oxidativo do DNA, corroborando com estudos de Evangelista et al (2004) onde verificaram o efeito anticlastogênico de compostos antioxidantes nos óleos de oliva e canola, que podem atuar por inibindo o dano oxidativo induzido por espécies

reativas de oxigênio (ERO). Alguns estudos *in vivo* e *in vitro* já demonstraram que o óleo da bocaiuva exibiu ausência de toxicidade aguda e subaguda em termos de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade (SILVA et al., 2019; TRAESEL et al., 2014; TRAESEL et al., 2015).

CONCLUSÃO

O presente estudo relata a avaliação do efeito do OPB na prevenção da lesão hepática não alcoólica aguda causada por agentes xenobióticos em camundongos. Inicialmente, obtivemos um óleo bruto de polpa de bocaiuva de alta qualidade, o qual pode ser utilizado em diversos outros ensaios. O modelo de indução de lesão hepática aguda pelo acetaminofeno mostrou-se eficaz para o estudo e, de acordo com nossa proposta, obtivemos resultados promissores em relação ao efeito do OPB na prevenção de lesões hepáticas causadas por medicamentos. Observamos diferenças significativas tanto na macroscopia quanto na microscopia hepática, bem como na análise sérica de ALT, um biomarcador importante no estudo de lesões hepáticas. No entanto, ainda são necessários estudos adicionais para elucidar o mecanismo de ação do OPB em relação à sua atividade hepatoprotetora.

REFERENCIAS

ANTER, J., J. CAMPOS-SÁNCHEZ, R. EL HAMSS, M. ROJAS-MOLINA, A. MUÑOZ-SERRANO, M. ANALLA, Á. J. M. R. G. T. ALONSO-MORAGA AND E. Mutagenesis. "Modulation of genotoxicity by extra-virgin olive oil and some of its distinctive components assessed by use of the *Drosophila* wing-spot test." 703(2): 137-142, 2010.

ANVISA. **Agência Nacional de Vigilância Sanitária.** Resolução nº 482, de 23 de setembro de 1999. Normas técnicas para identificação e qualidade de óleos e gorduras vegetais, 1999.

BAUER, I., VOLLMAR, B., JAESCHKE, H., RENSING, H., KRAEMER, T., LARSEN, R. Transcriptional activation of heme oxygenase-1 and its functional significance in acetaminophen-induced hepatitis and hepatocellular injury in the rat. **Journal Hepatology**, 33, 395-406, 2000.

BEKTUR, N.E.; SAHIN, E.; BAYCU, C.; UNVER, G. Protective effects of silymarin against acetaminophen-induced hepatotoxicity and nephrotoxicity in mice. **Toxicology and Industrial Health**, v. 32, n. 4), p. 89- 600, 2016.

CARACENI. P.; THIEL, D.H.V. Acute liver failure. **The Lancet**, 345:163-69, 1995.

CECCHI, H. M. Fundamentos teóricos e práticos em análise de alimentos. **Editora da UNICAMP:** 2º Ed. rev.- Campinas, SP, editora da UNICAMP, 207p, 2003.

CODEX ALIMENTARIUS. Normas para gorduras e óleos de Fontes Vegetais, Seção 2. Padrões do Codex Alimentarius para Óleos Vegetais Nomeados. Codex Alimentarius-Stan 210. 1999.

COIMBRA, M. C. AND N. J. F. R. I. JORGE. "Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits." 44(7): 2139-2142, 2011.

COSTA, G. L. A., D. F. BUCCINI, A. L. A. ARRUDA, S. P. FAVARO, S. E. J. F. S. MORENO and Technology. "Phytochemical profile, anti-inflammatory, antimutagenic and antioxidant properties of *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. pulp oil." 40: 963-971, 2020.

DAS, S.; ROY, P.; AUDDY, G.R.; MUKHERJEE, A. Silymarin nanoparticle prevents paracetamol-induced hepatotoxicity. **International Journal Nanomedicine**, v. 6, p. 1291-301, 2011.

DA SILVA, P. V., M. M. RAMIRO, E. K. IRIGUCHI, W. A. CORRÊA, J. LOWE, C. A. CARDOSO, A. C. ARENA, C. A. KASSUYA AND R. M. J. N. P. R. MUZZI. "Antidiabetic, cytotoxic and antioxidant activities of oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp." 33(16): 2413-2416, 2020.

EESHA, B.R.; AMBERKAR, M.V.; KUMARI, M.K.; LALIT, M.; RAJPUT, R. Hepatoprotective activity of *Terminalia paniculata* against paracetamol induced hepatocellular damage in Wistar albino rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 4, n. 6, p. 466-9, 2011.

ELGARAWANY, G. E.; ABDOU, A. G.; TAIE, D. M.; MOTAWEA, S. M. Hepatoprotective effect of artichoke leaf extracts in comparison with silymarin on acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Journal of Immunoassay and Immunochemistry**. v.41(1), p.84-96, 2019.

EVANGELISTA, C. M., ANTUNES, L. M., FRANCESCATO, H. D., & BIANCHI, M. L. Effects of the olive, extra virgin olive and canola oils on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rats. **Food and Chemical Toxicology**, 42(8), 1291-1297, v 2004.

FAO. Codex Alimentarius: Standard for named vegetable oils Codex Stan 210-1999. Roma: FAO/WHO, 15 p. 2019.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

GALAL, R.M.; ZAKI, F.H.; AGHA, M.A. Potential protective effect of honey against paracetamolinduced hepatotoxicity. **Archives of Iranian Medicine**, v. 15, n. 11, p. 674-80, 2012.

GIORDANO, C., J. RIVAS, X. J. J. O. C. ZERVOS AND T. Hepatology. "An update on treatment of drug-induced liver injury." 2(2): 74, 2014.

GUIDONI, M., M. DE CHRISTO SCHERER, M. FIGUEIRA, E. SCHMITT, L. DE ALMEIDA, R. SCHERER, S. BOGUSZ, M. J. B. J. O. M. FRONZA AND B. Research. "Fatty acid composition of vegetable oil blend and in vitro effects of pharmacotherapeutical skin care applications", 2019.

GHOSH, S.; SARKAR, A.; SIL, C.P. Silymarin protects mouse liver and kidney from thioacetamide induced toxicity by scavenging reactive oxygen species and activating PI3K-Akt pathway. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, p. 481, 2016.

GIANNINI, E.G.; TESTA, R.; SAVARINO, V. Liver enzyme alteration: a guide for clinicians. **Canadian Medical Association Journal**, v. 172, n. 3, p. 367-379, 2005.

HAU, D.K.; WONG, M.R.; CHENG, M.Y.G.; TONG, W.S.; LEUNG, M.K.A.; ZHU, Y.G.; LAU, Y.F.; FONG, F.W.D.. Novel use of silymarin as delayed therapy for acetaminophen-induced acute hepatic injury. **Forsch Komplementmed**, v. 17, n. 4, p. 209-13, 2010.

HERNÁNDEZ-RODAS, M. C.; VALENZUELA, R.; ECHEVERRÍA, F.; RINCÓN-CERVERA, M. A.; ESPINOSA, A.; ILLESCA, P.; MUÑOZ, P.; CORBARI, A.; ROMERO, N.; GONZALEZ-MAÑAN, D. Supplementation with docosahexaenoic acid and extra virgin olive oil prevents liver steatosis induced by a high-fat diet in mice through PPAR- α and Nrf2 upregulation with concomitant SREBP-1c and NF- κ B downregulation. **Molecular Nutrition & Food Research**. 61(12), 1700479, 2017.

HOLT, M.P., CHENG, L., JU, C. Identification and characterization of infiltrating macrophages in acetaminophen-induced liver injury. **Journal of Leukocyte Biology**, v.84, 1410- 1421, 2008.

JEONG, J.Y., LEE D.H., KANG, S.S. Effects of Chronic Restraint Stress on Body Weight, Food Intake, and Hypothalamic Gene Expressions in Mice. **Endocrinology. Metabolism**, 2013.

JOTHY, L.S., AZIZ, A., CHEN, Y., SASIDHARAN, S. Antioxidant activity and hepatoprotective potential of Polyalthia longifolia and Cassia spectabilis leaves against Paracetamol-induced liver injury. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2012.

JÚNIOR, E. O. C. Biomonitoramento em áreas poluídas e não poluídas do Rio Uberabinha, região de Uberlândia Minas Gerais, por meio de análise de micronúcleos e frequência de cromossomos B em bagre (*Rhamdia quelen*). 2011. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, Minas Gerais, 2011.

KAPLOWITZ, N. Idiosyncratic drug hepatotoxicity. **Nature Reviews Drug Discovery**. Jun;4(6):489-99, 2005.

KIRAN, P.M., RAJU, A.V., RAO, B.G. Investigation of hepatoprotective activity of Cyathea gigantea (Wall. ex. Hook.) leaves against paracetamol-induced hepatotoxicity in rats. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, 2012.

KISAOGLU, A.; OZOGUL, B.; TURAN, I., M.; YILMAZ, I.; BAKAN, E.; SULEYMAN, H. Damage induced by paracetamol compared with Nacetylcystein. **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 77, n. 9, p. 463-8, 2014.

LI, X., R. LIU, L. ZHANG AND Z. J. P. R. JIANG. "The emerging role of AMP-activated protein kinase in cholestatic liver diseases." 125: 105-113, 2017.

LI, X., R. SUN AND R. J. P. R. LIU. "Natural products in licorice for the therapy of liver diseases: Progress and future opportunities." 144: 210-226, 2019.

LIMA, J.; GOLÇALVES, L. A. G. Parâmetros de avaliação da qualidade de óleo de soja utilizado para fritura. **Química Nova**, v. 17, n.5, p. 392-296, 1994.

LLOVET, J. M., R. K. KELLEY, V. AUGUSTO, A. G. SINGAL, P. ELI, R. SASAN, L. RICCARDO, K. KAZUHIKO, J. ZUCMAN-ROSSI AND R. S. J. N. R. D. P. FINN. "Hepatocellular carcinoma (Primer)", 2021.

MAHMOOD, N. D.; MAMAT, S. S.; KAMISAN, F. H.; YAHYA, F.; KAMAROLZAMAN, M.F.F.; NASIR, N.; MOHTARRUDIN, N.; TOHID, S.F.; ZAKARIA, Z.A. Amelioration of paracetamolinduced hepatotoxicity in rat by the administration of methanol extract of Muntingiacalabura L. leaves. **BioMed Research International**, 1–10, 2014.

MALHI, H.; GORES, G. J.; LEMASTERS, J. J. Apoptosis and necrosis in the liver: a tale of two deaths? **Hepatology**, v. 43, n. 2 Suppl 1, p. S31-44, 2006.

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. 2006. Instrução para identidade e qualidade de vegetais refinados óleos. Diário Oficial da União, 26/12/2006, Seção 1, dezembro de 2006. Disponível em: http://www.azeiteonline.com.br/wp-content/uploads/2011/04/anvisa-instrucao_normativa49-de-22-12-2006-oleos-vegetais.pdf. (Acesso: 05 de março 2023).

MAPA. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução normativa para lista de espécies vegetais autorizadas, as designações, a composição de ácidos graxos e os valores máximos de acidez e de índice de peróxidos para óleos e gorduras vegetais. 15 de março de 2021. Disponível em: <https://www.in.gov.br/en/web/dou/-/instrucao-normativa-in-n-87-de-15-de-marco-de-2021-309008143> . (Acesso em 10 de junho de 2023).

NI, X.; WANG, H. Silymarin attenuated hepatic steatosis through regulation of lipid metabolism and oxidative stress in a mouse model of nonalcoholic fatty liver disease (NAFLD). **Am. J. Transl. Res.**, v. 8, n. 2, p. 1073-1081, 2016.

NITHIANANTHAM K, SHYAMALA M, CHEN Y, LATHA LY, JOTHY SL, SASIDHARAN S. Hepatoprotective potential of *Clitoria ternatea* leaf extract against Paracetamol induced damage in mice. **Molecules**. 2011.

NUNES, A. Óleo da polpa de macaúba (*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart.) com alta qualidade: processo de refino e termoestabilidade. **Dissertação** (Mestrado em Biotecnologia), Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande/MS, 2013.

OYAGBEMI, A.A., ODETOLA, A, A. Hepatoprotective effects of ethanolic extract of *Cnidoscolus aconitifolius* on paracetamol-induced hepatic damage in rats. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, 2010.

PAUL, S.; TANVIR, E.M.; DAS, S.; RUMPA, N.E.N.; HOSSEN, S.M.; PARVEZ, M.; GAN, H.S.; KHALIL, I.MD. Satkara (*Citrus macroptera*) Fruit Protects against AcetaminophenInduced Hepatorenal Toxicity in Rats. Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2016, p. 947-954, 2016.

RAJASEKARAN, A., PERIYASAMY, M. Hepatoprotective effect of ethanolic extract of *Trichosanthes lobata* on paracetamolinduced liver toxicity in rats. **Chinese Medicine**, 2012.

RAMESH, M. Microwave treatment of groundnut (*Arachis hypogaea*): Extractability and quality of oil and its relation to lipase and lipoxygenase activity. **Lebensmittel – Wissenschaft und Technologie**, v. 28, n.1, p.96-99, 1995.

RAMSDORF, W. Avaliação da toxicidade dos compostos fibronil, nitrato de chumbo e naftaleno em peixes. 2011. Tese (Doutorado em Ciências) – Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

RANDLE, L.E.; STAHLISH, G.J.; MACDONALD, I.; WILLIAMS, D.P.; PARK, K.B. Alpha(1)-adrenoceptor antagonists prevent paracetamol-induced hepatotoxicity in mice. **British Journal of Pharmacology**, v. 153, n. 4, p. 820-830, 2008.

RECORD, C. O.; ILES, R. A; COHEN, R. D.; WILLIAMS, R. Acid-base and metabolic disturbances in fulminant hepatic failure. **Gut Journal**, v. 16, n. 2, p. 144-9, 1975.

RIBEIRO, E. E. S. EAG Química de alimentos. **Edgard Blucher**. 2007.

SABINA, E.P., PRAGASAM, S.J., KUMAR, S., RASOOL, M. 6-Gingerol, an active ingredient of ginger, protects acetaminopheninduced hepatotoxicity in mice. **Chinese Journal of Integrative Medicine**, 2011.

SABIU. S., SUNMONU, T., O., AJANI, E., O, AJIBOYE, T., O. Combined administration of silymarin and vitamin C stalls acetaminophenmediated hepatic oxidative insults in Wistar rats. **Revista Brasileira Farmacologia** ;25(1):29-34, 2015.

SALWE, K., J, MANO, J., MANIMEKALAI, K. Hepatoprotective and antioxidant activity of Murraya Koenigii leaves extract against paracetamol induced hepatotoxicity in Rats. IJBCP; 6(6):1274-81, 2017.

SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J. AND C. A. M. J. R. B. D. F. CHUBA. "Caracterização biométrica, física e química de frutos da palmeira bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd." 33(3): 1023-1028, 2011.

SANT'ANA, C. T.; VEREDIANO, T.A.; GRANCIERI, M.; TOLEDO, R. C. L.; TAKO, E.; COSTA, N. M. B.; MARTINO, H. S. D.; DE BARROS, F.A. Macauba (*Acrocomia aculeata*) Pulp Oil Prevents Adipogenesis, Inflammation and Oxidative Stress in Mice Fed a High-Fat Diet. **Nutrients** v.15, n.5, p.1252, 2023.

SANTOS, A. F. Análise físico-química do óleo de polpa de pequi e aplicação em biscoito doce Programa Institucional de Iniciação Científica Relatório Final de Atividades (2009 a 2010). Curitiba, 2010.

SCHEX, R., V. M. LIEB, V. M. JIMÉNEZ, P. ESQUIVEL, R. M. SCHWEIGGERT, R. CARLE AND C. B. J. F. R. I. STEINGASS. "HPLC-DAD-APCI/ESI-MSn analysis of carotenoids and α -tocopherol in Costa Rican *Acrocomia aculeata* fruits of varying maturity stages." 105: 645-653, 2018.

SILVA, J.B.D.; MENDES, F.R.; OLIVEIRA, G.L.; RODRIGUES, N.M.; ARAGÃO, O.M.D.; AGUIAR, K.A.J.; RIBEIRO, A.; SCIO, E. New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of *Vernonia condensata* Baker. **Journal Ethnopharmacology**, v. 23, n. 198, p. 399-406, 2017.

SILVA, L. R. Propriedades físico-químicas e perfil dos ácidos graxos do óleo da andiroba. **Pesquisas Agrárias e Ambientais**, Nativa, Sinop, v.6, n.2, p.147-152, 2018.

TRAESSEL, G. K., SOUZA, J. C., DE BARROS, A. L., SOUZA, M. A., SCHMITZ, W. O., MUZZI, R. M., OESTERREICH, S. A., & ARENA, A. C. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. **Food and Chemical Toxicology**, 74, 2014.

TRAESSEL, G. K., CASTRO, L. H., SILVA, P. V., MUZZI, R. M., KASSUYA, C. A., ARENA, A. C., & OESTERREICH, S. A. Assessment of the cytotoxic, genotoxic, and mutagenic potential of *Acrocomia aculeata* in rats. **Genetics and Molecular Research**, 14(1), 585-596, 2015.

TENNANT, B.C. Hepatic function. In: KANEKO, J.J.; HARVEY, J.W.; BRUSS, M.L. Clinical Biochemistry of Domestic Animals. 5th ed. London: Academic Press, p.327-352, 1997.

TIMBRELL, J.A. November 18, by CRC Press Reference - 464 Pages - 232 B/W ISBN 9780849373022. 2008.

TSAI, M.S.; SHAW, M.H.; LIN, M.T.; LEE, T.W.; CHAN, S.K. Myeloperoxidase in chronic kidney disease: **Role of visceral fatory Nephrology**, v. 19, n. 3, p. 136-142, 2014.

VARGAS-MENDOZA, N.; MADRIGAL, E.; GONZALEZ, M.A.; SOTO, E.J.; GONZALES, Y.G.L.; GONZALEZ-MORALES, A.J. Hepatoprotective effect of silymarin. **World Jounal Hepatology**, v. 6, n. 3, p. 144-149, 2014.

VENTRO, G. J., Y. YANG, M. CHEN AND C. M. J. J. O. P. S. HARMON. "The molecular impact of omega 3 fatty acids on hepatic pro-inflammatory cytokine signaling." 52(6): 1020-1025, 2017.

WANG, L.; HUANG, H.Q.; LI, X.Y.; XIE, H.J.; DOU, Y.X.; SU, R.S.; ZENG, F.H.; CHEN, N.J. Protective effects of silymarin on triptolide-induced acute hepatotoxicity in rats. **Molecular Medicine Reports**, v. 17, n. 1, p. 789-800, 2018.

WIKTOROWSKA-OWCZAREK, A., M. NAMIECIŃSKA AND J. J. A. P. P. OWCZAREK. "The effect of ibuprofen on bFGF, VEGF secretion and cell proliferation in the presence of LPS in HMEC-1 cells." 72(5): 889-894, 2015.

YAHYA, F., MAMAT, S. S., KAMAROLZAMAN, M. F. F., SEYEDAN, A. A., JAKIUS, K. F., MAHMOOD, N. D.; ZAKARIA, Z. A. Hepatoprotective Activity of Methanolic Extract of *Bauhinia purpurea* Leaves against Paracetamol-Induced Hepatic Damage in Rats. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1–10, 2013.

ZHAO Y.L; ZHOU, D.G.; YANG, B.H.; SHAN, M.L.; XIAO, H.X. Rhein protects against acetaminophen-induced hepatic and renal toxicity. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 8, p. 1705-10, 2011.

XU, X.; WANG, D.; LI, Y.; DEYRUP, S.; ZHANG, H.J. A Model Construction of Starvation Induces Hepatic Steatosis and Transcriptome Analysis in Zebrafish Larva. **Phytochemistry Reviews**, V.10, 2021.