

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE

MIRELLY MARQUES ROMEIRO SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA E EFEITOS METABÓLICOS
DE *Astrocaryum huaimi* Mart. EM RATOS DIABÉTICOS

Campo Grande – MS
2022

MIRELLY MARQUES ROMEIRO SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA E EFEITOS METABÓLICOS
DE *Astrocaryum huaimi* Mart. EM RATOS DIABÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: Metabolismo e Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila Aiko Hiane.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisvânia Freitas dos Santos.

MIRELLY MARQUES ROMEIRO SANTOS

AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE AGUDA E SUBAGUDA E EFEITOS METABÓLICOS
DE *Astrocaryum huaimi* Mart. EM RATOS DIABÉTICOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste. Linha de pesquisa: Metabolismo e Nutrição.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila Aiko Hiane.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Elisvânia Freitas dos Santos.

Banca Examinadora

Nota/Conceito

Ana Cristina Jacobowski
Programa de pós Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região
Centro Oeste– UFMS

Luane Aparecida do Amaral
Universidade Estadual do Centro Oeste - UNICENTRO

Fabiane La Flor Ziegler Sanches
Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição – UFMS

Karla Rejane de Andrade Porto
Faculdade de Nutrição - FACSUL

Avaliação Final: () Aprovada () Reprovada

RESUMO

O objetivo do presente estudo foi avaliar o potencial toxicológico e os efeitos metabólicos da casca e polpa de tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) em ratos diabéticos. Os frutos de tucumã foram coletados na Fazenda São Sebastião, no município de Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brasil. Foram realizadas análises físicas, físico-químicas, teor de minerais, quantificação de ácidos graxos e análise de compostos antioxidantes. Para o teste de toxicidade oral aguda e subaguda foram utilizados 60 camundongos Swiss, divididos em: toxicidade aguda e toxicidade subaguda. Foram avaliadas possíveis alterações comportamentais, hematológicas, bioquímicas e histopatológicas. Para o experimento de padronização da indução de diabetes tipo 2 por meio da associação de dieta de cafeteria e estreptozotocina (STZ) foram utilizados 40 ratos Wistar machos, divididos em grupo controle e grupos diabéticos: 30, 35 e 40 mg/kg de STZ. Foram avaliados os seguintes parâmetros: antropométricos, ingestão de água e ração, bioquímicos e histopatológicos. Para a avaliação dos efeitos metabólicos da farinha de tucumã (FT) foram utilizados 43 ratos Wistar machos, alocados em 2 grupos controles: um grupo recebeu ração comercial, um grupo controle diabético + dieta de cafeteria e três grupos diabético + dieta de cafeteria + FT em 3 doses diferentes: 2%, 4% e 8% de FT. A indução do diabetes foi realizada com injeção única de STZ na dose de 35 mg/kg. Os grupos foram avaliados por meio de análises antropométricas, bioquímicas, teste de resistência à insulina e parâmetros histológicos. Os frutos de tucumã apresentaram em sua composição níveis apreciáveis de lipídios (18,28 g.100g⁻¹), fibras (35,95 g.100g⁻¹), vitamina C (14,35 mg.100g⁻¹), ferro (5,15 mg.100g⁻¹), potássio (1.776,05 mg.100g⁻¹) e ácidos graxos insaturados (58,86%). A análise dos compostos bioativos revelou que o extrato acetônico, seguido pelo extrato etanólico, apresentou a maior capacidade antioxidante e o maior nível de compostos fenólicos e taninos. No teste de toxicidade aguda e subaguda, a suplementação de farinha de casca e polpa de tucumã demonstrou ausência de letalidade, dano aos órgãos e alterações no comportamento geral dos

camundongos, indicando que todas as doses podem ser consideradas seguras para esses animais, fornecendo dados preliminares sobre o perfil tóxico de *Astrocaryum huaimi* Mart. O experimento desenvolvido para padronização de indução de diabetes tipo 2 provou ser um modelo eficiente e de baixo custo, sem perda de animais durante o experimento. As doses de 35 e 40mg/kg de estreptozotocina foram eficazes em mimetizar as características metabólicas da doença em humanos, confirmado pela presença de polidipsia, hiperglicemia, testes bioquímicos alterados, resistência à insulina e danos ao fígado, pâncreas e rim. Já no experimento que avaliou os efeitos metabólicos da FT, os animais que receberam a maior dose de suplementação de FT apresentaram maiores valores de consumo hídrico, glicemia e triglicerídeos, bem como menores valores de insulina e peptídeo C, quando comparados ao grupo controle. A suplementação de FT não foi eficiente em reverter ou minimizar os efeitos metabólicos ocasionados pelo diabetes tipo 2.

Palavras-chave: *Astrocaryum huaimi* Mart., Cerrado, toxicidade, diabetes, camundongos, ratos.

ABSTRACT

The aim of the present study was to evaluate the toxicological potential and the metabolic effects of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) peel and pulp in diabetic rats. The tucumã fruits were collected at Fazenda São Sebastião, in the municipality of Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brazil. Physical, physico-chemical, mineral content, quantification of fatty acids and analysis of antioxidant compounds were performed. For the acute and subacute oral toxicity test, 60 Swiss mice were used, divided into: acute toxicity and subacute toxicity. Possible behavioral, hematological, biochemical and histopathological changes were evaluated. For the experiment to standardize the induction of type 2 diabetes through the association of cafeteria diet and streptozotocin (STZ), 40 male Wistar rats were used, divided into a control group and diabetic groups: 30, 35 and 40 mg/kg of STZ. The following parameters were evaluated: anthropometric, water and feed intake, biochemical and histopathological. For the evaluation of the metabolic effects of tucumã flour (FT) 43 male Wistar rats were used, divided into 2 control groups: one group received commercial food, a diabetic control group + cafeteria diet and three diabetic groups + cafeteria diet + FT in 3 different doses: 2%, 4% and 8% TF. Induction of diabetes was performed with a single injection of STZ at a dose of 35 mg/kg. The groups were evaluated through anthropometric and biochemical analyses, insulin resistance test and histological parameters. The tucumã fruits presented in their composition appreciable levels of lipids (18.28 g.100g⁻¹), fiber (35.95 g.100g⁻¹), vitamin C (14.35 mg.100g⁻¹), iron (5.15 mg.100g⁻¹), potassium (1,776.05 mg.100g⁻¹) and unsaturated fatty acids (58.86%). The analysis of the bioactive compounds revealed that the acetone extract, followed by the ethanol extract, presented the highest antioxidant capacity and the highest level of phenolic compounds and tannins. In the acute and subacute toxicity test, the supplementation of tucumã peel and pulp meal demonstrated absence of lethality, organ damage and changes in the general behavior of mice, indicating that all doses can be considered safe for these animals, providing preliminary data. on the toxic profile of *Astrocaryum huaimi* Mart. The experiment developed for standardization of induction of type 2 diabetes proved to be an efficient and low-cost model, with no loss of animals during the experiment. Streptozotocin doses of 35 and 40mg/kg were effective in mimicking the metabolic characteristics of the disease in humans, confirmed by the presence of polydipsia, hyperglycemia, altered biochemical tests, insulin resistance and liver, pancreas and kidney damage. In the experiment that evaluated the metabolic effects of FT, the animals that received the highest dose of FT supplementation had higher values of water consumption, blood glucose and triglycerides, as well as lower insulin and C-peptide values,

when compared to the control group. FT supplementation was not efficient in reversing or minimizing the metabolic effects caused by type 2 diabetes.

Keywords: *Astrocaryum huaimi* Mart., Cerrado, toxicity, diabetes, mice, rats.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Palmeira de Tucumã (<i>Astrocaryum huaimi</i> Mart.).....	19
Figura 2. Fruto do tucumã (<i>Astrocaryum huaimi</i> Mart.).....	20

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AI: adiposity index
ALT: alanine aminotransferase
AST: aspartate aminotransferase
ANVISA: Agência Nacional de Vigilância Sanitária
CAPES: Coordination of Improvement of Higher Education Personnel
DIC: ionization detector
DM: diabetes mellitus
DM2: diabetes mellitus tipo 2
DM1: diabetes mellitus tipo 1
DNA: ácido desoxirribonucléico
DPPH: 1,1-diphenyl-2-picryl-hydrazyl
EAG: gallic acid equivalent
EAT: tannic acid equivalent
FT: flour of the bark and pulp of tucumã
FUNDECT: Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul
HDL: high-density lipoprotein
HE: hematoxylin/eosin
IDL: intermediate-density lipoprotein
LDL: low-density lipoprotein
MSE: mean standard error
NAD⁺: nicotina adenina dinucleotídeo
OECD: Organization for Economic Cooperation and Development
RDI: recommended daily intake
SBD: Sociedade Brasileira de Diabetes
STZ: estreptozotocina
UFMS: Universidade Federal de Mato Grosso do Sul
UTASP: Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública
VLDL: very low-density lipoprotein
%DV: daily value

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	12
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1	Teste de Toxicidade.....	14
2.1.1	Toxicidade Aguda.....	14
2.1.2	Toxicidade Subaguda.....	15
2.2	Diabetes Mellitus.....	16
2.3	Modelos Animais de Indução de Diabetes.....	17
2.4	Cerrado.....	18
2.5	Tucumã (<i>Astrocaryum huaimi</i> Mart.).....	19
3	OBJETIVOS.....	22
3.1	Objetivo Geral.....	22
3.2	Objetivos Específicos.....	22
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
4.1	Composição Físico-Química e Ácidos Graxos.....	23
4.2	Testes de Toxicidade.....	23
4.3	Modelo de Indução de Diabetes Mellitus Tipo 2.....	23
4.4	Efeitos Metabólicos da Farinha de Tucumã.....	23
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	24
5.1	Composição Físico-Química e Ácidos Graxos.....	24
5.2	Testes de Toxicidade.....	40
5.3	Modelo de Indução de Diabetes Mellitus Tipo 2.....	61
5.4	Efeitos Metabólicos da Farinha de Tucumã.....	72
6	CONCLUSÃO.....	90

7	REFERÊNCIAS.....	91
	ANEXO 1 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – Teste de Toxicidade.....	95
	ANEXO 2 – PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – Diabetes Tipo 2.....	96

1 INTRODUÇÃO

A incidência expressiva de doenças crônicas não transmissíveis como a obesidade, o diabetes mellitus, hipertensão arterial e câncer estão associadas as mudanças nos padrões alimentares, como a crescente substituição do consumo de alimentos *in natura*, que são fontes de fibras, vitaminas e minerais, por alimentos industrializados, que são ricos em ácidos graxos saturados e açúcares (BRASIL, 2014; FRUMKIM e HAINES, 2019).

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2019) no ano de 2017 o Brasil ocupava a 4ª posição (12,5 milhões de pessoas diabéticas) dentre os países com maior número de pessoas com Diabetes mellitus (DM), perdendo apenas para China (114,4 milhões), Índia (72,7 milhões) e Estados Unidos da América (30,2 milhões). Estimativas apontam que no ano de 2045, este número deve alcançar 628,6 milhões de pessoas com esta síndrome no mundo, e a projeção para o Brasil são de 20,3 milhões de pessoas diabéticas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). O aumento da prevalência de diabetes deve-se, sobretudo, a fatores como: rápida urbanização, transição epidemiológica, transição nutricional, excesso de peso, crescimento e envelhecimento populacional e maior sobrevivência de pessoas com diabetes (SBD, 2017).

De acordo com a American Diabetes Association (2019), o Diabetes mellitus tipo 2 (DM2) corresponde a 90 a 95% de todos os casos de diabetes. O DM2 acomete principalmente pessoas acima de 40 anos de idade, no entanto, sua incidência tem aumentado entre jovens e crianças (SBD, 2017). Histórico familiar de DM2, obesidade, sedentarismo, pré-diabetes ou diabetes gestacional e síndrome metabólica são fatores de risco para o desenvolvimento desta doença (SBD, 2019).

A alimentação é um fator essencial no tratamento e prevenção de DM2, sendo que as escolhas alimentares têm efeito direto sobre o equilíbrio energético, peso corporal, pressão arterial e lipídios plasmáticos, os quais são elementos essenciais no manejo da doença (SBD, 2019). Koss-Mikołajczyk *et al.* (2019) afirmam que um maior consumo de frutas e verduras está associado com a diminuição do risco de doenças cardiovasculares, câncer, obesidade e diabetes.

No Cerrado predominam espécies de frutas que são consideradas fontes de proteínas, fibras, ácidos graxos, calorias, vitaminas e minerais e possuem grande potencial antioxidante. Geralmente são consumidas *in natura* ou utilizadas como ingredientes em algumas preparações, com grande aceitação popular (CALDEIRA *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2013).

Alguns estudos com frutos nativos do Cerrado demonstraram efeitos positivos no controle das alterações metabólicas em animais diabéticos (SALES, 2011; GUIMARÃES, 2013; NUNES *et al.*, 2018). Sales (2011), avaliou o efeito da suplementação de jatobá em ratos diabéticos e observou que o grupo que recebeu o concentrado de jatobá teve diminuição significativa da glicemia ($p < 0,05$), em comparação com o grupo controle (que não recebeu a suplementação). Guimarães (2013), avaliou o potencial funcional de farinhas de jerivá e bacaba em ratos normoglicêmicos, observou que os grupos que receberam a farinha de jerivá a 10% e farinha de bacaba a 15% apresentaram diminuição da glicemia pós-prandial (109,3 e 108,6 mg/dl-1 respectivamente) ao comparar com o grupo controle (122,3 mg/dl-1). Nunes *et al.* (2018) avaliaram os efeitos da suplementação do óleo da semente de macaúba em ratos diabéticos e observaram redução dos níveis de glicose sanguínea, bem como menor ganho de peso nos animais que receberam a suplementação, quando comparados com os animais do grupo controle diabético.

Diante do exposto, se faz necessário mais estudos visando o conhecimento da composição, bem como das possíveis utilizações dos frutos do Cerrado, tendo em vista o grande potencial para utilização na prevenção e tratamento de doenças devido as particularidades nutricionais de cada fruto. Dentre a grande variedade de frutos do Cerrado, encontra-se o tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.), o qual possui frutos de formato elipsoides, lisos de cor alaranjada ou alaranjada-amarelada quando maduros, com mesocarpo fibro-carnoso e adocicado (LORENZI *et al.*, 2004). Alguns estudos apontam que os frutos do tucumã apresentam em sua composição teores apreciáveis de lipídios, fibras, altos teores de ácidos graxos monoinsaturados, ferro e potássio (FERREIRA *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2010; SANTOS *et al.*, 2017; SANTOS *et al.*, 2018).

Tendo em vista os fatos expostos e a falta de estudos nessa área, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial toxicológico e os efeitos metabólicos do tucumã no DM2.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Teste de toxicidade

As indústrias farmacêuticas vêm desenvolvendo pesquisas com plantas nativas, extraindo compostos ou moléculas para formular medicamentos (PIMENTEL *et al.*, 2015). No entanto, para utilizar produtos naturais na formulação de novos medicamentos ou até mesmo na medicina popular é necessário a realização de testes de toxicidade para avaliação da segurança do consumo de determinado elemento na saúde humana (TRAESSEL *et al.*, 2014; LIMA *et al.*, 2017).

Pensando nisso, no ano de 2008 foram estabelecidos protocolos pela Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) que norteiam os estudos de toxicidade aguda e de doses repetidas (subaguda e crônica), os quais subsidiam a utilização posterior de fitoterápicos, dando credibilidade e segurança ao produto (OECD, 2008a, 2008b).

Além da OECD, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) lançou em 2013 o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Este guia contempla estudos de toxicidade aguda e subaguda e genotoxicidade que avaliam o grau de agressão do produto às células e a capacidade de ocorrência de mutação, com o resultado negativo destes testes é possível assegurar o consumo de plantas fitoterápicas no Brasil (ANVISA, 2013).

2.1.1 Toxicidade Aguda

O teste de toxicidade aguda é um modelo utilizado para testar um elemento em uma única dose, por meio da avaliação do consumo de água, consumo de ração, peso corporal, triagem hipocrática e por fim a análise macroscópica dos órgãos (MALONE; ROBICHAUD, 1962; OECD, 2008^a; AMARAL *et al.*, 2019).

Esse teste deve ser realizado preferencialmente em roedores, fêmeas (nulíparas e não grávidas), com idade entre 8 a 12 semanas, visto que as fêmeas são mais susceptíveis a danos toxicológicos devido ao sistema hormonal (OECD, 2008a).

A triagem hipocrática deve ser realizada em cada animal após a administração do composto durante os primeiros 30 minutos, após 24 horas, e todos os dias por um período de 14 dias. Essa triagem avalia: o estado consciente, atividade e coordenação do sistema motor e tonificação muscular (resposta ao toque e aperto da cauda, alisamento, força para agarrar), reflexos (córnea e orelhas), atividades no sistema nervoso central (tremores, convulsões, sedação, anestesia e ataxia) e atividades no sistema nervoso autônomo (lacrimação, cianose, ptose, salivação e piloereção) (MALONE; ROBICHAUD, 1962).

De acordo com as orientações da OECD (2008a), para realizar o teste de toxicidade aguda é necessário primeiramente reunir o máximo de informações possíveis a respeito do composto a ser testado. Isso inclui conhecer a estrutura química, propriedades físico-químicas e se já houver na literatura dados de outros ensaios de toxicidade *in vitro* ou *in vivo*, para que se possa determinar a relevância deste teste para saúde humana bem como orientar a escolha da dose inicial apropriada.

Para substâncias que o grau de toxicidade é baixo ou nulo, utiliza-se a dose de 2000mg/kg em um total de 5 animais. Primeiramente é administrado uma dose do composto em 1 animal, se este animal morrer, é realizado o teste principal, o qual é iniciado com uma dose baixa e vai aumentando a cada animal. No caso de o animal sobreviver, é administrado a dose em mais 4 animais (total de 5 animais para o teste). Estes 5 animais serão acompanhados por um período de 14 dias após a administração do composto. Se 3 animais morrerem durante este período é realizado o teste principal, no caso de mais de 3 animais permanecerem vivos é suposto que a DL50 seja superior a dose testada (OECD, 2008a).

2.1.2 Toxicidade Subaguda

O teste de toxicidade subaguda consiste na administração oral da substância a ser avaliada em várias doses pré-determinadas diariamente por um período de 28 dias. Esse teste é de extrema importância para avaliação de substâncias que serão utilizadas por um longo período. Para realização deste teste utiliza-se roedores machos e fêmeas (nulíparas e não grávidas) recém desmamados ou antes de 9 semanas de vida dos animais. São utilizados 10 animais (5 machos e 5 fêmeas) por grupo, e deve ser realizado pelo menos 3 grupos para substância teste (3 doses diferentes) e 1 grupo controle (OECD, 2008b).

De acordo com a OECD (2008b) as doses devem ser escolhidas de acordo com dados de toxicidade pré-existent, e o nível mais alto da dose deve ser determinado com o objeto de induzir efeitos tóxicos, sem causar sofrimento grave ou morte dos animais. As doses comumente utilizadas na literatura são: 125, 250, 500 e 1000 mg/kg (LIMA *et al.*, 2017; BRANQUINHO *et al.*, 2017; SALDANHA *et al.*, 2018).

Ainda, nesse teste é de extrema importância a inclusão de um grupo satélite (5 machos e 5 fêmeas) nos grupos controle e substância teste (utiliza-se a dose máxima). Esse grupo receberá a substância teste diariamente por 28 dias e após esse período permanecerá em observação por mais 14 dias (sem receber a substância teste). O objetivo do grupo satélite é observar se há reversibilidade, persistência ou atraso no desenvolvimento de efeitos tóxicos resultantes da administração da substância teste (OECD, 2008b).

Assim como no teste de toxicidade aguda, são avaliados o consumo de água, consumo de ração, peso corporal, triagem hipocrática e análise macroscópica dos órgãos com a adição das análises hematológicas, bioquímicas e histopatológicas (OECD, 2008b).

2.2 Diabetes mellitus

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2019) no ano de 2017 o Brasil ocupava a 4ª posição (12,5 milhões de pessoas diabéticas) dentre os países com maior número de pessoas com Diabetes mellitus (DM), perdendo apenas para China (114,4 milhões), Índia (72,7 milhões) e Estados Unidos da América (30,2 milhões). Estimativas apontam que no ano de 2045, este número deve alcançar 628,6 milhões de pessoas com esta síndrome no mundo todo, e a projeção para o Brasil são de 20,3 milhões de pessoas diabéticas (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2017). O aumento da prevalência de diabetes deve-se, sobretudo, a fatores como: rápida urbanização, transição epidemiológica, transição nutricional, excesso de peso, crescimento e envelhecimento populacional e maior sobrevivência de pessoas com diabetes (SBD, 2017).

O termo Diabetes mellitus descreve uma desordem metabólica de etiologia múltipla caracterizada por hiperglicemia crônica que acarreta alterações do metabolismo de carboidratos, gorduras e proteínas resultante de defeitos na ação ou secreção da insulina, ou ambos. Os sintomas da hiperglicemia acentuada no paciente diabético incluem poliúria (aumento do volume urinário) polidipsia (aumento da ingestão hídrica), polifagia (aumento da ingestão alimentar) e significativa perda de peso (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2019).

O Diabetes mellitus tipo 1 (DM1) se trata de uma doença autoimune, poligênica, decorrente da destruição das células β pancreáticas, que leva a deficiência completa na produção insulínica (SBD, 2019). Mais de 30 mil brasileiros são portadores de DM1, colocando o Brasil como terceiro colocado em prevalência de DM1 no mundo (INTERNATIONAL DIABETES FEDERATION, 2015).

De acordo com a American Diabetes Association (2019), o diabetes mellitus tipo 2 corresponde a 90 a 95% de todos os casos de diabetes. O DM2 acomete principalmente pessoas acima de 40 anos de idade, no entanto sua incidência tem aumentado dentre jovens e crianças. Histórico familiar de DM2, obesidade, sedentarismo, pré-diabetes ou diabetes gestacional e síndrome metabólica são fatores de risco para o desenvolvimento da doença (SBD, 2019).

2.3 Modelos animais de indução de diabetes

A indução do diabetes experimental em modelos animais é realizada através do uso de substâncias que destroem seletivamente as células beta do pâncreas, produtoras de insulina. As substâncias mais utilizadas para indução do diabetes em roedores são a aloxana e a estreptozotocina (STZ) (SZKUDELSKI, 2001). Ambas são citotóxicas, análogos da glicose e, embora as suas citotoxicidades ocorram através de diferentes mecanismos, o modo de captação de ambas as substâncias pelas células beta do pâncreas é o mesmo, ocorrendo através do transportador de glicose do tipo GLUT 2 (LENZEN, 2008).

Ambos os agentes químicos, aloxana e estreptozotocina, induzem uma deficiência da produção de insulina pela morte das células beta. Embora os mecanismos de captação de ambas as substâncias pelas células beta pancreáticas via transportadores de glicose GLUT2 e resultante morte das mesmas por necrose sejam idênticos, a ação tóxica da aloxana é mediada via espécies reativas de oxigênio, e da estreptozotocina via alquilação do ácido desoxirribonucléico (DNA) das células beta. No entanto, devido à maior estabilidade química da estreptozotocina em relação à aloxana, a primeira tem sido o agente mais usado para reprodução do diabetes em roedores (LENZEN, 2008).

A STZ é um glicosídeo nitrosuréia natural isolado do fungo *Streptomyces achromogenes*. Este xenobiótico tem sido usado para induzir tanto o DM1 quanto o DM2, dependendo da concentração, dose e via de administração. Quando utilizada em animais, determina uma severa deficiência de insulina com quadro de hiperglicemia. Na dose de 160 a 250 mg/Kg, apresenta efeito citotóxico direto nas células beta de camundongos, causando danos no DNA, como fragmentação e alquilação do mesmo, exaurindo a nicotina adenina dinucleotídeo (NAD⁺), que inibe a biossíntese e a secreção de insulina e, deste modo, dando início a morte das células beta, através da depleção de energia (NEGRI, 2005; SZKUDELSKI, 2001).

No ano 2000 Reed *et al.*, desenvolveram um novo modelo animal para mimetizar as características do DM2. Este ensaio envolve a combinação de uma dieta *high-fat*, com o objetivo de provocar hiperinsulinemia, resistência à insulina e/ou intolerância à glicose seguida da administração de uma baixa dose de STZ, resultando em uma diminuição severa na função e massa de células β do pâncreas (SKOVSO, 2014). No entanto ainda há divergências na literatura científica quanto a dose de STZ que é efetiva na indução do DM2. Wang *et al.* (2014) e Derkach *et al.* (2015) utilizaram uma dose de 25mg/Kg de estreptozotocina em seu estudo. Já Qian *et al.* (2015) usou a dose de 30 mg/Kg, enquanto Castro *et al.* (2017) e Khare *et al.* (2017) usaram a dose de 35 mg/kg.

2.4 Cerrado

O Cerrado é considerado uma das mais ricas vegetações do mundo com aproximadamente 12 mil plantas catalogadas e ocorre principalmente na região centro-norte do Brasil, cobrindo cerca de 24% do território brasileiro, sendo a segunda em termos de cobertura de área nacional (BOLFE *et al.*, 2020).

O bioma do Cerrado é caracterizado como um *hotspot*, ou seja, um dos ambientes mais ricos e ameaçados do mundo. É conhecido devido sua biodiversidade, que se destaca por conta das inúmeras espécies nativas pouco conhecidas que fornecem frutos com características peculiares e que podem assumir um importante papel na economia da população nativa, como a comercialização *in natura* ou processados, como também na questão nutricional, que através do seu consumo pode favorecer a diminuição da insegurança alimentar (HAMACEK *et al.*, 2013).

Predominam várias espécies de frutas que são consideradas fontes de proteínas, fibras, ácidos graxos, calorias, vitaminas e minerais como o cálcio e o fósforo e possuem grande potencial antioxidante. Geralmente são consumidas *in natura* ou utilizadas como ingredientes em algumas preparações, com grande aceitação popular (CALDEIRA *et al.*, 2004; RAMOS *et al.*, 2008; MORAIS *et al.*, 2013).

De Souza *et al.* (2012) avaliaram a composição centesimal dos frutos de marolo (*Annona crassiflora* Mart), murici (*Byrsonima crassifolia* L. RICH), jenipapo (*Genipa americana* L.), graviola (*Annona muricata* L.) e maracujá-doce (*Passiflora alata* Dryand), frutos provenientes do Cerrado brasileiro. Os autores obtiveram o maior valor para proteínas: maracujá doce (1,35%), lipídios: marolo (1,84%), carboidratos: marolo (16,31%), fibras: murici (3,08%), fósforo: maracujá-doce (34,95 mg/100 g), potássio: marolo (391,48 mg/100 g), cálcio: jenipapo (13,23 mg/100 g), magnésio: marolo (26,28 mg/100 g) e ferro: maracujá-doce (1,06 mg/100 g).

Em um estudo que avaliou os compostos bioativos e atividade antioxidante de três espécies de frutos do Cerrado brasileiro, sendo: carnaúba (*Copernicia prunifera*), murici (*Byrsonima crassifolia* L. Rich) e oiti (*Licania tomentosa* Benth Fritsch), os autores relataram o maior valor para fenólicos totais: oiti (1236,42 mg GAE 100⁻¹), antocianinas: carnaúba (9,35 mgcy-3-glu.100 g⁻¹), carotenoides totais: murici (20,00 mg-β-carot.100g⁻¹), vitamina C: carnaúba (78,1 mg.100⁻¹) e atividade antioxidante: oiti (14721,69 μmol TEAC. 100 g⁻¹) (MOREIRA-ARAÚJO *et al.*, 2019).

Com relação a composição de ácidos graxos presentes em frutos do Cerrado brasileiro, Lopes *et al.* (2012), avaliaram a composição dos frutos de marolo (*Annona Crassiflora* Mart.), coquinho-azedo (*Butia Capitata* Mart.) e pequi (*Caryocar Brasiliense* Camb.), os autores

obtiveram os maiores valores de ácidos graxos saturados: pequi (43,52%) e ácidos graxos insaturados: araticum (79,33 %).

2.5 Tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.)

O tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) (Figura 1) também conhecido como tucumã-de-Goiás e tucumã-do-brejo, é encontrado principalmente nos Estados de Goiás, Tocantins, Mato Grosso e Minas Gerais, ocorrendo geralmente em várzeas úmidas e brejosas próximas a cursos d'água. Essa espécie apresenta caule geralmente cespitoso, de 3 a 7 metros de altura e 5 a 15 centímetros de diâmetro, é densamente coberto com espinhos longos, achatados e negros (LORENZI *et al.*, 2004).



Figura 1. Palmeira de Tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.).

(Fonte: O autor, 2020)

Os seus frutos (Figura 2) são elipsóides com 3,5 a 4,5 cm de comprimento e 2 a 3 cm de diâmetro, são lisos de cor alaranjada ou alaranjada-amarelada quando maduros, com mesocarpo fibro-carnoso e adocicado (LORENZI *et al.*, 2004).



Figura 2. Fruto do tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.).

(Fonte: O autor, 2020)

Em um estudo que avaliou a composição da polpa seca (mesocarpo+exocarpo) dos frutos do tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.), os autores obtiveram os seguintes valores para umidade: 10,22%, cinzas: 3,58%, proteínas: 5,18%, lipídios: 18,28%, carboidratos: 31,46%, fibra total: 35,95%, fibra solúvel: 3,29%, fibra insolúvel: 32,66% e calorias: 311,08 kcal/100g (SANTOS *et al.*, 2018).

Alguns estudos avaliaram a composição de ácidos graxos presentes no óleo da polpa do tucumã. Os autores relataram um alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, predominando o ácido oleico em sua composição, com os seguintes valores: 67,62% (FERREIRA *et al.*, 2008), 65,10% (RODRIGUES *et al.*, 2010), 75,34% (SANTOS *et al.*, 2017) e 45,28% (SANTOS *et al.*, 2018).

De acordo com Santos *et al.* (2018), a polpa seca dos frutos do tucumã apresenta 14,35 mg.100g⁻¹ de vitamina C, 162,84 mg.100g⁻¹ de cálcio, 5,15 mg.100g⁻¹ de ferro, 67,33 mg.100g⁻¹ de fósforo, 89,42 mg.100g⁻¹ de magnésio, 1.776,05 mg.100g⁻¹ de potássio, 14,87 mg.100g⁻¹ de sódio em sua composição, classificando o tucumã como fonte de ferro e potássio, conforme a Portaria nº 31/1998 da Secretaria de Vigilância em Saúde (BRASIL, 1998).

Ainda, os frutos do tucumã podem ser considerados excelentes fontes de carotenoides, como observado nos estudos de Rosso e Mercadante (2007), os quais encontraram 21 tipos diferentes de carotenoides na polpa do fruto, com destaque para o all-trans- β -caroteno (47,36 μ /g), já no estudo de Matos *et al.*, (2019) que avaliaram os teores de carotenoides na casca do tucumã, observaram teores apreciáveis de β -caroteno (7,8 mg/100g) em sua composição, e no estudo de Santos *et al.*, (2021), que determinaram o teor total de carotenoides do óleo da polpa do tucumã, foi observado um teor médio de 511,00 mg/kg.

Ao observar a composição nutricional dos frutos do tucumã, ressalta-se o teor de fibras alimentares e de ácidos graxos monoinsaturados, especialmente o ácido oleico. Estes compostos têm mostrado efeitos benéficos relacionados ao DM2. Em um estudo de revisão, Mc Rae (2018), observou que o aumento da ingestão de fibras alimentares demonstrou efeitos benéficos na prevenção do desenvolvimento de DM2, e que o consumo de fibras solúveis auxilia na redução da glicemia em jejum de pacientes com DM2. Em outro estudo de revisão, Weickert e Pfeiffer (2018) observaram que as fibras solúveis apresentaram efeitos benéficos na melhora da resposta glicêmica pós prandial, e o consumo de fibras insolúveis reduz o risco de desenvolvimento de DM2, bem como ajudam na diminuição da resistência à insulina. Palomer et al. (2018) e Rehman et al. (2020), relatam que o ácido oleico apresenta efeitos protetores com relação ao desenvolvimento do DM2, e ainda aumenta a sensibilidade a insulina.

Considerando a escassez de estudos que avaliem uma possível ação tóxica desta espécie, a presente proposta de pesquisa destina-se a avaliar o perfil toxicológico em modelo experimental de toxicidade aguda, toxicidade subaguda, bem como estudar *in vivo* os efeitos metabólicos da farinha da casca e polpa do tucumã (FT), por meio da suplementação na alimentação de animais diabéticos, levando em consideração a sua composição nutricional e tendo em vista que o DM2 é um problema de Saúde Pública, o qual acomete grande parte da população mundial.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar o potencial toxicológico e os efeitos metabólicos da casca e polpa de tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) em ratos diabéticos.

3.2 Objetivos específicos

- a) Determinar a composição físico-química e ácidos graxos da FT;
- b) Certificar a segurança do uso da FT em modelos de toxicidade aguda e subaguda;
- c) Padronizar o modelo de indução de DM2;
- d) Avaliar os efeitos metabólicos da FT em ratos diabéticos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Composição físico-química e ácidos graxos

Os materiais e métodos desse experimento estão apresentados na forma de artigo, intitulado: “Physical-chemical, nutritional and antioxidant properties of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) fruits”, publicado no periódico Semina: Ciências Agrárias, qualis/CAPES B1, fator de impacto: 0,564.

4.2 Testes de toxicidade

Os materiais e métodos desse experimento estão apresentados na forma de artigo, intitulado: “Evaluation of acute and subacute (28 days) oral toxicity of the flour bark and pulp of tucuma (*Astrocaryum huaimi* Mart.) in mice”, a ser submetido ao periódico Drug and Chemical Toxicology, qualis/CAPES A4, fator de impacto: 1,946. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética (Protocolo nº 894/2017) (Anexo I) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

4.3 Modelo de indução de DM2

Os materiais e métodos desse experimento estão apresentados na forma de artigo, intitulado: “Combination of cafeteria diet with intraperitoneally streptozotocin in rats. A type-2 diabetes model”, publicado no periódico Acta Cirúrgica Brasileira, qualis/CAPES B1, fator de impacto: 1,388. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética (Protocolo nº 895/2017) (Anexo II) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

4.4 Efeitos metabólicos da FT

Os materiais e métodos desse experimento estão apresentados na forma de artigo, intitulado: “Efeitos metabólicos da farinha de tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) em ratos diabéticos”, a ser submetido no periódico Acta Cirúrgica Brasileira, qualis/CAPES B1, fator de impacto: 1,388. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética (Protocolo nº 895/2017) (Anexo II) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Composição físico-química e ácidos graxos

Os resultados desse experimento estão apresentados a seguir, na forma de artigo, intitulado: “Physical-chemical, nutritional and antioxidant properties of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) fruits”, publicado no periódico Semina: Ciências Agrárias, qualis/CAPES B1, fator de impacto: 0,564.

DOI: 10.5433/1679-0359.2018v39n4p1517

Physical-chemical, nutritional and antioxidant properties of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) fruits

Caracterização físico-química, nutricional e antioxidante de frutos de tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.)

Mirelly Marques Romeiro Santos¹; Dayane Stéphanie Fernandes²; Camila Jordão Cândido³; Leandro Fontoura Cavaleiro⁴; Anderson Fernandes da Silva⁵; Valter Aragão do Nascimento⁶; Manoel Mendes Ramos Filho⁷; Elisvânia Freitas dos Santos^{8*}; Priscila Aiko Hiane⁸

Abstract

The Brazilian Cerrado contains a large number of fruit species whose nutritional and physical-chemical properties have not been fully characterized to date. The fruit of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart) is ellipsoid with fibrous and gelatinous pulp, unique odor, and has significant economic importance in the region. The objective of this study is to analyze the physical-chemical, nutritional, and antioxidant properties of the fruit of tucumã grown in Minas Gerais state, Brazil. Water content, ashes, proteins, lipids, carbohydrates, total dietary fiber, pH, titratable acidity, soluble solids, vitamin C, minerals, and fatty acids were analyzed. Total phenols, tannins, and antioxidant activity were analyzed using the Folin-Ciocalteu method, Folin-Denis method, and photocolometric method of the stable free radical DPPH, respectively, in aqueous, acetone, and ethanol extracts. The most relevant components in the fruit were lipids, fibers, vitamin C, unsaturated fatty acids, iron, potassium, manganese, and bioactive compounds. The analysis of the bioactive compounds revealed that the fruit has high antioxidant activity. The acetone extract presented the highest antioxidant capacity followed by the ethanol and aqueous extracts. The results indicated that the tucumã fruit has high nutritional value as a source of lipids, fibers, calories, vitamin C, minerals, and unsaturated fatty acids, and high antioxidant activity. Therefore, consuming the tucumã fruit pulp may help prevent nutritional deficiencies and chronic non-communicable diseases.

Key words: Functional food products. Cerrado. Fruit.

¹ Discente de Doutorado, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: mirellymarques@hotmail.com

² Discente de Mestrado, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: daystephaniefernandes@gmail.com

³ Pesquisadora, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: cahjordao@gmail.com

⁴ Pesquisador, Instituto de Química, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: lernfc@gmail.com

⁵ Pesquisador, Laboratório de Metabolismo Mineral e Biomateriais, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: alemao_fer@hotmail.com

⁶ Prof. Laboratório de Metabolismo Mineral e Biomateriais, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: aragao60@hotmail.com

⁷ Prof., Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, UFMS, Campo Grande, MS, Brasil. E-mail: manioel_filho@ufms.br

⁸ Prof., Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentos e Nutrição, Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, UFMS, MS, Brasil. E-mail: elisvania@gmail.com; priscila.hiane@ufms.br

* Author for correspondence

Received: Oct. 02, 2017 - Approved: May 28, 2018

1517

Resumo

O Cerrado Brasileiro é responsável por uma ampla riqueza de espécies frutíferas que ainda não foram estudadas em relação às suas características nutricionais e físico-químicas. O tucumã é um fruto elipsoide de polpa fibrosa, consistência pastosa e odor característico, representando uma importante atividade econômica regional. O objetivo deste estudo foi analisar as propriedades físico-químicas, nutricionais e antioxidantes do fruto tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart) do Estado de Minas Gerais. Foram realizadas análises físicas, umidade, cinzas, proteínas, lipídios, carboidratos, fibra alimentar total, pH, acidez titulável, sólidos solúveis, vitamina C, minerais e ácidos graxos. Fenóis totais, taninos e a atividade antioxidante foram analisados pelo método Folin-Ciocalteu, Folin-Denis e pelo método fotolorimétrico do radical livre estável DPPH, respectivamente, em três extratos: aquoso, acetônico e etanólico. Os constituintes que se destacaram no fruto foram lipídios, fibras, vitamina C, ácidos graxos insaturados, ferro, potássio, manganês e compostos bioativos. Em relação aos compostos bioativos analisados foi possível verificar o elevado potencial antioxidante desse fruto. Dentre os extratos analisados, o acetônico foi o que apresentou a maior capacidade antioxidante seguido do etanólico e do aquoso. Os resultados indicaram que o fruto de tucumã apresenta importantes propriedades nutricionais, como fonte de lipídios, fibras, calorias, vitamina C, minerais, ácidos graxos insaturados, bem como elevado potencial antioxidante. O consumo de polpa de tucumã poderá contribuir para prevenir carências nutricionais e também na prevenção de doenças crônicas não transmissíveis.

Palavras-chave: Alimento funcional. Cerrado. Fruto.

Introduction

The Brazilian Cerrado has the highest biodiversity of all savanna biomes worldwide, with 7,000 species, of which many are endemic (KLINK; MACHADO, 2005). Native populations may benefit from the high diversity of local fruits, market them as in natura or processed foods, and include them in the diet to increase the nutritional status and reduce food insecurity (HAMACEK et al., 2013).

The tucumã belongs to the family Arecaceae (palm trees), genus *Astrocaryum*, and is popularly known as “tucumanzeiro” (CARDOSO et al., 2013). This species is more common in the Amazon region but is also found in other regions. The fruit has an ellipsoid shape with a length of 3 to 5 cm, thickness of 2 to 4 mm, yellow-orange color when ripe, fibrous and gelatinous pulp, and characteristic odor (FERREIRA et al., 2008). It is widely used by the Amazon peoples, who consume almost all parts of the palm tree. The mesocarp (pulp) is highly appreciated by the local population and is used for producing ice creams, popsicles, and tapioca and sandwich fillings. The pulp is also used as feed for

cattle, pigs, fish, and chickens, and for producing soap (SHANLEY, 2005). The tucumã is classified as a product of extractivism of medium importance and has significant economic importance in the region (MOUSSA; KAHN, 1997).

Therefore, searching for new food sources that are rich in bioactive compounds, such as antioxidants in phenolic compounds and tannins, is essential. Brazil has a rich biodiversity, and it is possible to study several fruits and determine their unique properties. The study of antioxidants is vital because many chronic non-communicable diseases are associated with an imbalance in the production of free radicals and antioxidants (ZIMMERMANN; KIRSTEN, 2008). The higher consumption of fruits and vegetables is associated with a decrease in the rate of chronic non-communicable diseases because these foods have high antioxidant activity (COSTA et al., 2013; SANTOS et al., 2014).

The objective of this study is to analyze the physical-chemical, nutritional, and antioxidant properties of the fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart) from the state of Minas Gerais, Brazil.

Material and Methods

The fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) were collected at the Fazenda São Sebastião in the municipality of Limeira do Oeste, Minas Gerais state, Brazil, at the geographical coordinates 19°18'42" S, 50°43'25" W. The fruits were labeled and registered in the Herbarium of the Federal University of Mato Grosso do Sul (CGMS) under Registration No. 54609. The collection was performed in December 2014. One bunch of fruit was collected from each palm tree, totaling three bunches of fruits. Each bunch contained approximately 200 fruits, which were selected according to the color of the exocarp (peel) (yellow-orange), indicating they were fully ripe.

In the laboratory of the Food Technology and Public Health Unit (Unidade de Tecnologia de Alimentos e Saúde Pública-UTASP) of CCBS at the Federal University of Mato Grosso do Sul, the fruits were selected, and the deteriorated and damaged fruits were discarded. After that, the fruits were washed in running water for further analysis.

Physical analyses

The length and diameter of the whole fruit were determined using a Stainless Hardened digital caliper with a precision of 0.01 mm. The weight of the whole fruit, exocarp (peel), mesocarp (pulp), endocarp (seed), and kernel was measured on a Shimadzu analytical scale after manual pulping (LIMA et al., 1986).

Sample preparation

Fruit pulping consisted of separating the mesocarp and exocarp using a stainless steel knife, and this material was designated raw pulp. The obtained raw pulp was dried at 45 °C in a forced air circulation oven for 2 days. The dried material was crushed roughly in a cutter (SIRE®) and later in a turax-type homogenizer (TECNAL®). The

homogenized samples were sieved in a 60-mesh sieve to achieve granulometric uniformity. After that, the samples were packaged, identified, and used for physical-chemical analyses.

Physical-chemical analyses

All physical-chemical analyses were conducted in triplicate. The evaluated parameters were water content, pH, and titratable acidity using the methodologies of the Adolfo Lutz Institute (IAL, 2008). Proteins were determined using the Micro-Kjeldahl method with factor 6.25. Lipids were analyzed using the Soxhlet method according to AOAC protocols (2000). Reducing sucrose, non-reducing sucrose, and starch were quantified using the Lane-Eynon reductometric method (BRASIL, 2005). The total dietary fiber content was determined using the enzymatic method with α -amylase (Termamyl®), enzymatic digestion with protease (Alcalase®) and amyloglucosidase (AMG®) for hydrolysis, and filtration in ethanol for extraction of fibers using the method AOAC 985.29 described by AOAC (2000). The ascorbic acid content was determined by titration with 2,6-dichlorophenolindophenol according to the AOAC method (1995). Three grams of homogenized "in natura" sample were used for quantifying soluble solids. A gauze was used to filter the solid particles, and two drops of the homogenate were placed in the prism of a digital refractometer model HI 96801 (Hanna Instruments Brazil, São Paulo, São Paulo). The value obtained by spectrophotometry was multiplied by two.

Cobalt, iron, manganese, magnesium, nickel, potassium, calcium, sodium, cadmium, copper, zinc, chromium, molybdenum, silicon, and phosphorus were quantified using inductively coupled plasma optical emission spectrometry (Thermo Fisher Scientific, Cambridge, England) model iCAP 6300 Duo (POUSSEL; MERMET, 1995).

Quantification of fatty acids

Lipids were extracted by cold extraction using the method of Bligh and Dyer (1959). After extraction, a 100-mg aliquot of the lipid sample was transferred to a screw-capped tube, 2 mL of methanolic sodium hydroxide was added to the test tube, and the solution was heated in a water bath for 5 min. After that, 6 mL of the esterification mixture was added to the warm solution and heated for 3 min. After this step, 5 mL of distilled water was added to the tube, and the solution was agitated (HARTMAN; LAGO, 1973).

The formed methyl esters were extracted by adding 6 mL of hexane (three 2-mL aliquots in sequence), and the organic phase (supernatant) was transferred to another tube using a Pasteur pipette. The methyl ester solution was washed with two 5-mL volumes of saturated sodium bicarbonate solution. The organic phase was transferred to another screw-capped tube, and the solvent was evaporated. After that, the solution was filtered and transferred to Eppendorf tubes.

The fatty acids extracted from the fruit samples were determined using a Varian gas-liquid chromatograph (model CP-3800) with a fused silica capillary column (length, 30 m; internal diameter, 0.25 mm; BPX-70, 70% cyanopropyl polysilphenylsiloxane) and a flame ionization detector (FID) with a split/splitless-type injector. The gases used in the detector were helium (carrier gas) at a flow rate of 1.0 mL/min, synthetic air, and hydrogen. Nitrogen was used as an auxiliary gas. The working temperature in the injector was 200 °C. The temperature in the column was 80 °C for 2 min, then increased at a rate of 4 °C per min until it reached 220 °C, and was maintained at 220 °C for 10 min. The temperature of the detector was 250 °C. The peaks of the isolated fatty acid fractions were identified by comparison with the retention times of pure fatty acid methyl esters (Sigma) and quantified by area normalization. The results were expressed as percentages (%). The analyses were conducted

in the Laboratory of Fuel Analysis (Laboratório de Análises de Combustíveis-LABCOM) of the Department of Chemistry of the Federal University of Mato Grosso do Sul (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS).

Determination of the daily value (%DV)

The %DV was calculated using 40 g of the sample based on the values recommended for subjects of both sexes aged 19 to 50 years (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005). The nutrients were evaluated using mean values for carbohydrates, proteins, lipids, and dietary fiber.

The %DV of minerals was calculated using 40 g of the sample based on the recommended values for subjects of both sexes aged 19 to 50 years (FAO, 2001).

Analysis of antioxidant compounds

The bioactive compounds were analyzed using the raw pulp of fruits "in natura." The extracts were prepared according to the methodology of Roesler et al. (2007) using the aqueous, ethanol, and acetone extractions. The aqueous extraction was carried out using distilled water at a fruit:water ratio of 1:3 (m v⁻¹). The ethanolic extraction was performed using 95% alcohol at a fruit:alcohol ratio of 1:3 (m v⁻¹). The acetone extraction was performed using acetone at a fruit:acetone ratio of 1:3 (m v⁻¹). For each extraction, the material was homogenized for 20 min using a Kline stirrer. After that, the sample was filtered in gauze and re-extracted in the same solvent under the same conditions, and the filtrate was transferred to a 50-mL flask. Phenolic compounds, tannins, and antioxidant activity were determined in the extracts (BATISTA, 2013; ROESLER et al., 2007).

The antioxidant capacity for sequestering free radicals was evaluated using the photocolometric method of the stable free radical 1,1-diphenyl-

2-picryl-hydrazyl (DPPH) (MELO et al., 2006; ALI et al., 2007). The method was based on the sequestration of DPPH by the antioxidants present in the samples, and absorbance was read at 517 nm in a spectrophotometer. Different concentrations of ethanolic solutions were prepared from the aqueous, ethanol, and acetone extracts by adding 1800 μL of DPPH (0.004% m v^{-1}), and the final volume was adjusted to 2000 μL with ethanol. Each sample was incubated at room temperature for 30 min in the dark. The ability to sequester free radicals was expressed as a percentage of inhibition of radical oxidation, calculated by the formula % inhibition = $((A_{\text{DPPH}} - A_{\text{extr}})/A_{\text{DPPH}}) \times 100$, where A_{DPPH} was the absorbance of the DPPH solution, and A_{extr} was the absorbance of the sample in solution (ROESLER et al., 2007). The results were expressed as IC_{50} , which represents the fresh mass in grams of the sample per gram of DPPH used in the reaction (RUFINO et al., 2010).

Total phenols were quantified using the Folin-Ciocalteu method (SWAIN; HILLS, 1959), which involves the reduction of the reagent by the phenolic compounds present in the sample and the formation of a blue complex whose absorbance is read at 760 nm in a spectrophotometer. The reaction mixture contained 0.5 mL of the extract, 2.5 mL of the Folin-Ciocalteu reagent, and 2 mL of a saturated solution of sodium carbonate. A standard curve was constructed with gallic acid at the concentrations of 0.025, 0.075, 0.09, and 0.105 mg mL^{-1} . The results were expressed as mg of gallic acid equivalent in 100 g^{-1} of fresh sample using the formula $\text{EAG} = (C \times V/M) \times 100$, where C was the concentration

obtained in the curve (mg/mL), V was the sample volume in the reaction (mL), and M was the sample mass in the reaction (g).

Total tannins were quantified using the Folin-Dennis method (BRASIL, 2005), which involved the reduction of the reagent and formation of a blue complex whose absorbance was read at 760 nm. The reaction mixture contained 0.5 mL of the extract, 1.0 mL of the Folin-Dennis reagent, and 1 mL of saturated sodium carbonate solution, and the final volume of 10 mL was completed with distilled water. A standard curve was constructed with tannic acid. The results were expressed as mg of tannic acid equivalent in 100 g^{-1} fresh sample using the formula $\text{EAT} = (C \times V/M) \times 100$, where C was the concentration obtained in the curve (mg mL^{-1}), V was the sample volume in the reaction (mL), and M was the sample mass (g) in the reaction.

Statistical analysis

Data were analyzed using the software Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 22.0 and expressed as the mean $\pm$ standard deviation. The comparisons were performed using ANOVA followed by Tukey's post-hoc test. P-values of less than 0.05 were considered significant.

Results and Discussion

The values obtained in the physical analysis of the "in natura" samples and the comparison with literature data are shown in Table 1.

Table 1. Physical parameters of the fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) from Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brazil.

Parameters	Mean $\pm$ SD	Ferreira et al. (2008) <i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.	Simões (2010) <i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.
Peel weight (g)	2.26 $\pm$ 0.55	6.75	6.90
Pulp weight (g)	5.37 $\pm$ 3.52	5.68	3.64
Seed weight (g)	8.43 $\pm$ 3.36	10.03	10.00
Dry seed weight (g)	6.37 $\pm$ 1.26	-	-
Dry kernel weight (g)	2.44 $\pm$ 0.52	-	-
Fruit circumference (cm)	10.08 $\pm$ 0.62	-	-
Fruit diameter (mm)	27.27 $\pm$ 1.86	31.23	32.32
Mesocarp thickness (mm)	2.88 $\pm$ 0.43	-	-
Seed thickness (mm)	2.95 $\pm$ 0.75	-	-
Kernel thickness (mm)	5.02 $\pm$ 0.53	-	-
Exocarp thickness (mm)	0.54 $\pm$ 0.17	-	-

SD: standard deviation.

The mean peel weight, seed weight, and fruit diameter were smaller than those obtained by Ferreira et al. (2008) and Simões (2010) for *Astrocaryum vulgare* Mart. The pulp weight in our study was similar to that found by Ferreira et al. (2008) but higher than that found by Simões (2010). No literature data on the other physical parameters were found. Oliveira et al. (2003) reported that differences in the physical parameters might be due to the analyzed species, climate, soil, and fruiting period, leading to different results regarding fruit size, weight, and composition.

The edible part of the tucumã fruit (pulp + dry kernel) represents 48.6% of the total weight of the fruit, thus presenting adequate composition for culinary preparations and providing nutrients (RAMOS et al., 2008).

The mean values obtained in the analysis of the physical-chemical composition of the dry raw pulp (mesocarp + exocarp) using a 100-gram sample as reference are shown in Table 2.

The mean water content of the dry raw pulp was 10.22%, which differed from the study of Yuyama et al. (2008), whereby the mean water content of the dry and milled pulp of *A. aculeatum* Meyer. from

Rio Preto da Eva, Amazonas, Brazil, was 1.67%. This difference is probably due to the intensity of the drying process applied in each study and the evaluated species. In contrast, Damasceno et al. (2008) analyzed the dry pulp of *A. vulgare* Mart. from the northeastern region of Pará and the state of Maranhão, and the water content varied from 3.47% to 9.55%, which is similar to the value obtained in our study.

The percentages of ashes, proteins, and total carbohydrates in the dry raw pulp were similar to those found by Damasceno et al. (2008) and Yuyama et al. (2008).

It is of note that tucumã fruits have high lipid content. This characteristic contributes considerably to its high energy content. The mean percentage of lipids was 18.28 $\pm$ 0.04%, which is similar to that found by Damasceno et al. (2008) (18.88 $\pm$ 0.03%) (13.53-50.72%). The percentage found by Yuyama et al. (2008) was 61.60 $\pm$ 0.62%, which is higher than that of the study by Damasceno et al. (2008) and the present study. Ferreira et al. (2008) obtained a percentage of 40.49% in the in natura fruit of *A. vulgare* Mart. from the region of Mazagão, Amapá, Brazil.

Table 2. Physical-chemical composition (g.100g⁻¹) of the dry raw pulp (mesocarp + exocarp) of tucumã fruits (*Astrocaryum huaimi* Mart.) from Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brazil.

Components (g.100g ⁻¹)	Mean ± SD	Damasceno et al. (2008) <i>Astrocaryum vulgare</i> Mart. Dry	Yuyama et al. (2008) <i>Astrocaryum aculeatum</i> Meyer. Dry
Water content (%)	10.22 ± 0.25	3.47-9.55	1.67
Ashes	3.58 ± 0.06	1.78-3.32	2.4
Proteins	5.18 ± 0.11	4.35-8.81	6.7
Lipids	18.28 ± 0.04	13.53-50.72	61.60
Total carbohydrates	31.46 ± 0.04	33.16-71.03	27.63
Glucose	11.24 ± 0.00	ND	ND
Sucrose	0.01 ± 0.00	ND	ND
Starch	20.21 ± 0.04	ND	ND
Total dietary fiber	35.95 ± 0.01	ND	ND
Soluble dietary fiber	3.29 ± 0.01	ND	ND
Insoluble dietary fiber	32.66 ± 0.01	ND	ND
Calories (kcal.100g ⁻¹)	311.08	ND	ND

SD: standard deviation. ND: not determined.

Other authors observed that the lipid content of tucumã fruits varied considerably. Oliveira et al. (2013) studied *A. vulgare* Mart. from the Germplasm Bank of Embrapa Amazônia Oriental, and indicated that the percentage of lipids, on a dry basis, in the fruit mesocarp varied from 11.80% to 73.80%. Aragão (2013) reported that the percentage of lipids in the pulp in natura was 22.94%, corresponding to approximately 41.67% in dry basis, according to the water content obtained. The percentage of lipids in the mesocarp + exocarp of *A. aculeatum* in natura from two municipalities of the state of Amazonas varied from 33.9% to 37.5% (YUYAMA et al., 2005).

Ferreira et al. (2008) hypothesis that variations in fruit composition are because of different species analyzed, in addition to fruit heterogeneity and environmental factors such as climate, soil, growth temperature, and fruiting period. Aragão (2013), Damasceno et al. (2008), and Oliveira et al. (2013) studied *A. vulgare* Mart. from northeastern Pará and the state of Maranhão, whereas Yuyama et al.

(2008) studied *A. aculeatum* Meyer. from Rio Preto da Eva, Amazonas state.

The mean total dietary fiber of the fruits was 35.95%. The percentages found by Aragão (2013), Fernandes et al. (2007), Yuyama et al. (2005) were 9.0%, 14.21%, and 24.1-35.4%, respectively. The percentage of insoluble dietary fiber was 32.66%, corresponding to 90.85% of the total dietary fiber. The inclusion of fibers in the diet is advocated because of their health benefits, including improvement of intestinal transit, increase in fecal volume, delay in glucose absorption, and prevention of colon cancer (FERREIRA et al., 2008).

The physical-chemical composition of the fruit per serving (two units), with an approximate weight of 40 g, and the recommended daily intake (RDI) expressed as %DV of the raw pulp are presented in Table 3.

The mean levels of nutrients were 2,214.25 Kcal/day of total energy, 275.5 g/day of carbohydrates, 82.9 g/day of proteins, 82.25 g/day of lipids, and 15.97 g/day of fiber, according to the RDI (2005).

Table 3. Physical-chemical composition per serving ($g.40g^{-1}$)* and daily recommended intake (DRI) expressed as percentage daily value (%DV) of the dry raw pulp (mesocarp + exocarp) of the fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) from Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brazil.

Components ($g.40g^{-1}$)	Mean $\pm$ SD	%DV
Moisture content	4.09 $\pm$ 0.25	--
Ashes	1.43 $\pm$ 0.06	--
Proteins	2.07 $\pm$ 0.11	2.49
Lipids	7.31 $\pm$ 0.04	8.88
Total carbohydrates	12.58 $\pm$ 0.04	4.57
Glucose	4.5 $\pm$ 0.00	--
Sucrose	0.004 $\pm$ 0.00	--
Starch	8.08 $\pm$ 0.04	--
Total dietary fiber	14.38 $\pm$ 0.01	90.04
Soluble dietary fiber	1.32 $\pm$ 0.01	--
Insoluble dietary fiber	13.06 $\pm$ 0.	--
Calories, kcal.40g ⁻¹	124.43	5.62

SD: standard deviation. %DV: nutrients evaluated by the mean recommended daily intake (2005) based on a diet of 2,214.25 Kcal.
*Serving approximately equivalent to two units.

These results indicate that the fruit is a good source of lipids and fibers (BRASIL, 2012), especially insoluble fibers, and can significantly improve the nutritional status of native populations. Considering that the mean RDI of lipids and fibers for adults of both sexes aged 19 to 50 years was 82.25 g/day and 15.97 g/day, respectively (INSTITUTE OF MEDICINE, 2005), the consumption of 40 g of raw pulp (mesocarp + exocarp) supplies 8.88% and 90.04% of the daily requirements of these

two nutrients, respectively. Dietary fibers have several health benefits by increasing intestinal transit, lowering blood cholesterol, decreasing starch hydrolysis, delaying glucose absorption, and reducing the risk of colon complications (FERREIRA et al., 2008).

The pH, soluble solids, titratable acidity, and vitamin C content of the tucumã fruits are shown in Table 4.

Table 4. Physical-chemical parameters analyzed in the fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) from Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brazil.

Parameter	Mean $\pm$ SD
pH	4.90 $\pm$ 0.01
Soluble solids (°Brix)	7.75 $\pm$ 0.07
Titratable acidity (%)	0.21 $\pm$ 0.02
Vitamin C (mg.100g ⁻¹)	14.35 $\pm$ 2.07

SD: standard deviation.

The mean pH (4.90) was lower than that found by Aragão (2013) (5.90) and Yuyama et al. (2008) (5.71-5.89) in dry and in natura pulp, respectively, in *A. vulgare* Mart.

The titratable acidity of the dry fruit was lower than that obtained by Aragão (2013) in in natura pulp (0.32%) and by Yuyama et al. (2008) in dry pulp (0.60%). The factors responsible for the quality of the fruits in the palm tree are the soil, climate, and stage of maturation. Therefore, the pH is a critical parameter in fruit conservation. The acidity is related to the stage of maturation such that the pH is decreased as the fruit matures (SILVA et al., 2009).

The soluble solids indicate the concentration of dissolved substances in the fruit juice, and the production of these solids depends on the maturation stage (SILVA et al., 2009). The amount of soluble solids (°Brix) in the fruit pulp (7.75 ° Brix) was lower than that reported by Aragão (2013) (10.0 ° Brix).

The levels of vitamin C (14.35 mg.100g⁻¹) (Table 4) were higher than those described by Aragão (2013) (1.34 mg.100g⁻¹) in the pulp and lower than

those found by Santos et al. (2015) (19 mg.100g⁻¹) in the mesocarp and exocarp of *A. vulgare* Mart. from the Macapá region. Considering that the mean RDI of vitamin C for adults of both sexes aged 19 to 50 years is 82.5 mg/day (DRI, 2005), the consumption of 40 g of the raw pulp provides 6.9% of the daily requirement of vitamin C.

Vitamin C is unstable to light, high temperatures, and oxygen, and these factors need to be minimized for achieving a reliable analytical result (LEE; KADER, 2000). This substance is vital for human health and is found in many fruits. Vitamin C has antioxidant activity and is involved in the production of several hormones and synthesis of connective tissue; its antioxidant activity depends on pH, such that the higher is the acidity, the higher is the antioxidant activity (SILVA et al., 2009).

The minerals found in the dry raw pulp of the tucumã fruit are shown in Table 5.

Table 5. Mineral composition (mg.100g⁻¹) per serving (mg.40g⁻¹) and recommended daily intake (RDI) per serving (40 g, corresponding to 2 units) of dry pulp (mesocarp + exocarp) of the fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) from Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brazil.

Minerals	Mean ± SD mg.100g ⁻¹	Serving mg.40g ⁻¹	%DV	RDA**
Calcium	162.84 ± 3.88	65.14	6.51%	1000 mg/day
Cadmium	0.003 ± 0.0004	0.0012	ND	ND
Cobalt	0.0091 ± 0.001	0.0036	ND	ND
Copper	0.50 ± 0.03	0.20	0.022	900 mg/day
Chromium	0.25 ± 0.05	0.10	0.33%	30 µg/day*
Iron	5.15 ± 0.59	2.06	15.85%	13 mg/day
Phosphorus	67.33 ± 5.55	26.93	3.85%	700 mg/day
Magnesium	89.42 ± 1.35	35.77	9.9%	362.5 mg/day
Manganese	5.49 ± 0.26	2.20	107.34%	2.05 mg/day*
Molybdenum	0.70 ± 0.05	0.28	0.62%	45 µg/day
Nickel	0.40 ± 0.09	0.16	ND	ND
Potassium	1,776.05 ± 38.93	710.42	15.11%	4,700 mg/day*
Silicon	28.25 ± 1.95	11.30	ND	ND
Sodium	14.87 ± 0.21	5.95	0.40%	1,500 mg/day*
Zinc	0.99 ± 0.04	0.40	4.21%	9.5 mg/day

SD: standard deviation; %DV: nutrients evaluated as the mean recommended daily allowance (RDA); **Mean values recommended for subjects of both sexes aged 19 to 50 years; NA: not available; * Mean recommended values according to AI.

Iron, manganese, and potassium were the most abundant. The amount of the other analyzed minerals was not significant but might contribute to the nutritional value of the fruit when used for supplementing the diet.

The RDI for a healthy individual of both sexes is 13 mg/day for iron, 2.05 mg/day for manganese, and 4,700 mg/day for potassium. Therefore, consuming one serving of pulp corresponding to two units of the fruit provides 15.85%, 107.34%, and 15.11% of the RDI for iron, manganese, and potassium, respectively. Simões (2010) evaluated minerals in the fruit flour of *A. vulgare* Mart.) and the obtained values were lower than those of this study (4.3 mg of iron/100g and 1,100 mg of potassium/100g).

The level of manganese was higher than the RDI for this nutrient for men and women aged 19 to 50 years. However, this level does not pose a health risk because it is lower than the maximum tolerable limit (10 mg/day, mean value for both sexes) and, for this reason, the inclusion of this fruit in the diet is recommended.

The Ministerial Order No. 31/1998 of the Health Surveillance Secretariat (BRASIL, 1998), which establishes requirements for classifying solid foods as having a low mineral content (15%) or high mineral content (30%), determined that the dry pulp of the tucumã fruit could be classified as a source of iron and potassium and a reliable source of manganese for healthy subjects of both sexes aged 19 to 50 years.

Iron is an essential micronutrient and contributes to cognitive performance, immune status, overall metabolism, and production of hormones, including thyroid hormones. Its deficiency has adverse effects, especially anemia, which is a serious public health problem (WHO, 2001).

Potassium plays a vital role in muscle contraction, regulation of the cardiac rhythm, conduction of nerve impulses, and maintenance of the electrolyte balance. Potassium is also crucial for preventing and treating arterial hypertension (PEREIRA, 2005).

The composition of the fatty acids in the tucumã fruit is shown in Table 6.

Table 6. Fatty acid profile of the fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) from Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brazil, compared to literature data.

Fatty acid	Structure	Fatty acid (%)	Ferreira et al. (2008) <i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.	Simões (2010) <i>Astrocaryum vulgare</i> Mart.
Saturated				
Butyric acid	C4:0	2.39	ND	ND
Caproic acid	C6:0	0.69	ND	ND
Lauric acid	C12:0	0.05	ND	0.03
Myristic acid	C14:0	0.14	ND	0.09
Pentadecylic acid	C15:0	0.05	ND	0.02
Palmitic acid	C16:0	25.46	22.90	25.94
Margaric acid	C17:0	0.16	ND	0.12
Stearic acid	C18:0	0.14	2.95	2.67
Arachidic acid	C20:0	0.11	ND	0.14
Behenic acid	C22:0	0.07	ND	0.03
Tricosanoic acid	C23:0	0.05	ND	ND
Lignoceric acid	C24:0	0.09	ND	0.04
Total saturated fatty acids		29.40		

continue

continuation

Unsaturated fatty acids

Heptadecenoic acid	C17:1	0.04	ND	0.07
Oleic acid	C18:1n9c	45.28	67.62	63.47
Linolelaidic acid	C18:2n6t	0.47	-	-
Linoleic acid	C18:2n6c	10.71	1.15	1.2
Linolenic acid	C18:3n3	1.85	ND	3.14
Eicosenoic acid	C20:1n9	0.37	ND	0.27
11,14-eicosadienoic acid	C20:2n6	0.04		ND
Erucic acid	C22:1n9	0.10	ND	-
Total unsaturated fatty acids		58.86		
NI		11.74		

NI: not identified. ND: not determined.

The nutritional composition was 29.4 of saturated fatty acids, and the major component was palmitic acid (25.46%). The most abundant unsaturated fatty acids were oleic acid, monounsaturated omega 9, linoleic acid, and polyunsaturated omega 6, and these substances accounted for 95.12% of all the unsaturated fatty acids. These results corroborate those found by Ferreira et al. (2008), Morais and Gutjahr (2012), and Simões (2010), confirming that oleic acid is the most abundant unsaturated fatty

acid in the tucumã fruit. Therefore, determining the fatty acid profile of food products is fundamental for better characterizing these products and possible adverse effects. Healthy fats are essential sources of unsaturated fatty acids, which protect against cardiovascular diseases and are suitable for consumption (SANTOS et al., 2013).

The levels of tannins, total phenols, and the antioxidant activity of the raw pulp "in natura" of the tucumã fruit are shown in Table 7.

Table 7. Tannins, total phenols, and antioxidant activity in the aqueous, acetone, and ethanol extracts of raw pulp "in natura" of the fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) from Limeira do Oeste, Minas Gerais, Brazil.

Extracts	Tannins (mg EAT.100g ⁻¹) ¹	Total phenols (mg EAG.100g ⁻¹) ²	Antioxidant activity (IC ₅₀) ³
Aqueous	31.10 ± 0.34 ^c	62.17 ± 0.96 ^c	259.95 ± 0.75 ^a
Acetone extract	90.77 ± 1.13 ^a	87.80 ± 2.48 ^b	115.76 ± 5.67 ^c
Ethanol extract	63.57 ± 1.52 ^b	101.78 ± 1.88 ^a	138.49 ± 0.89 ^b
p-value	<0.0001	<0.0001	<0.0001

¹ mgEAT.100g⁻¹ = mg of tannic acid equivalent per 100 g of sample. ² mgEAG.100g⁻¹ = mg of gallic acid equivalent per 100 g sample. ³ IC₅₀ = g of sample per g of DPPH¹ used in the reaction. Values (mean ± SD) in the same column followed by different letters were different using Tukey's test (p<0.05).

There was a significant variability ($p < 0.0001$) in the concentration of bioactive compounds in the analyzed extracts. The level of tannins in the acetone extract was 90.77 ± 1.13 mg EAT.100g⁻¹ and was higher than that present in the ethanol and aqueous extracts. Phenolic compounds were more abundant in the ethanol extract (101.78 ± 1.88 mg EAG.100g⁻¹) than in the acetone and aqueous extracts. The aqueous extract presented the lowest antioxidant capacity ($IC_{50} = 259.95 \pm 0.75$) followed by the ethanol and acetone extracts.

The extraction of phenolic compounds in natural products is affected by the solvent used in the extraction such that the higher is the polarity of the extract, the higher is the extraction yield (GAMÉZ-MEZA et al., 1999). Therefore, polarity was higher in the extracts with higher extraction yield. The extraction of antioxidants is different in each extract because of the need for higher or lower concentrations of the antioxidants to reduce the activity of free radicals (ROCHA et al., 2013).

Santos et al. (2015) evaluated the antioxidant activity in the mesocarp and endocarp of *A. vulgare* Mart. using several methods, including the DPPH method, as was also the case in the present study. The antioxidant activity in the tucumã fruit was high ($IC_{50} = 3,343$) but lower than that found in this study. Santos et al. (2015) found that the fruit extracts with high antioxidant activity contained higher levels of polyphenols. The same result was observed in the present study, indicating a relationship between polyphenols and the antioxidant activity.

The levels of total phenols in the three extracts were higher than those found by Aragão (2013) in the buffered pulp extract of tucumã fruit at pH 7.0 (59.60 mg EAG.100g⁻¹). Santos et al. (2015) analyzed polyphenols in the mesocarp and endocarp of fruits of *A. vulgare* Mart. and the obtained values were 159 mg GAE.100g⁻¹ in the combined methanol and acetone extract, and this level was higher than that of this study.

Plants subjected to stress conditions, including

pathogens and lack of nutrients, increase the production and storage of phenolic compounds because these compounds help protect the plant against external factors (IGNAT et al., 2011; CARVALHO et al., 2009).

The results of the physical-chemical analysis indicated that the consumption of pulp of the tucumã fruit should be promoted because of the high levels of macronutrients and micronutrients, favorable fatty acid composition, and high levels of bioactive compounds, and therefore this product may help prevent nutritional deficiencies and chronic diseases and promote additional health benefits. However, additional studies on this fruit are necessary because, to the best of our knowledge, no studies to date evaluated the macronutrients, micronutrients, antioxidants, total phenols, and tannins in the fruits of *A. huaimi* Mart.

Conclusion

Our results indicate that including tucumã fruits in the diet may help increase the intake of lipids, fibers, calories, vitamin C, minerals, unsaturated fatty acids, and bioactive compounds.

This fruit has high levels of vitamin C. Iron, potassium, and manganese were the most abundant minerals, and the fruit was classified as a source of iron and potassium and as a rich source of manganese, suggesting the possibility of consuming whole or fractionated fruits to supplement minerals.

The analysis of the fatty acid profile indicated the predominance of unsaturated fatty acids. The analysis of bioactive compounds revealed that the acetone extract, followed by the ethanol extract, presented the highest antioxidant capacity and the highest level of phenolic compounds and tannins.

Acknowledgments

Foundation for Support to the Development of Education, Science, and Technology of the State

of Mato Grosso do Sul (Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul-FUNDECT) and the Federal University of Mato Grosso do Sul (Universidade Federal de Mato Grosso do Sul-UFMS).

References

- ALI, S. S.; KASOJU, N.; LUTHRA, A.; SINGH, A.; SHARANABASAVA, H.; SAHU, A.; BORA, U. Indian medicinal herbs as sources of antioxidants. *Food Research International*, Toronto, v. 41, n. 1, p. 1-15, 2007.
- ARAGÃO, A. B. *Caracterização bioquímica e centesimal das espécies *Astrocaryum vulgare* Mart. (tucumã) e *Endopleura uchi* (Huber) Cuatrec. (uci) nativas da região amazônica*. 2013. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Instituto de Química, Universidade Estadual Paulista, Araraquara.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC. Official methods of analysis. 16th ed. Washington: AOAC, 1995.
- _____. Official methods of analysis. Chapter Cereal Foods. Gaithersburg, Maryland, USA: AOAC, 2000. v. 32, 5 p.
- BATISTA, L. C. L. *Qualidade nutricional e atividade antioxidante de laranjinha de pacu *Pouteria glomerata* (Miq.) Radlk. do Cerrado e do Pantanal*. 2013. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste) - Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Campo Grande.
- BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. *Canadian Journal Biochemistry Physiology*, Ottawa, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. *Métodos físico-químicos para análises de alimentos*. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 1018 p.
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 31, de 13 de janeiro de 1998. Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes essenciais. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 16 jan. 1998. Seção I-E, p. 4.
- _____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Resolução n.54, de 12 de novembro de 2012. Regulamento técnico sobre informação nutricional complementar. *Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil*, Brasília, 12 nov. 2012.
- CARDOSO, T. N.; ABREU, L. F.; FERNANDES, A. C.; MACEDO, P. C. F. Determinação de carotenoides em frutos de Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). In: SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA E SEMINÁRIO DE PÓS-GRADUAÇÃO DA EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL, 17., 1., 2013, Belém. *Anais...* Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2013. p. 1-4.
- CARVALHO, F. M. V.; MARCO JÚNIOR, P. de.; FERREIRA, L. G. The Cerrado into pieces: habitat fragmentation as a function of landscape use in the savannas of central Brazil. *Biological Conservation*, Essex, v. 142, n. 7, p. 1392-1403, 2009.
- COSTA, A. G. V.; GARCIA-DIAZ, D. F.; JIMENEZ, P.; SILVA, P. I. Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *Journal of Functional Foods*, Amsterdam, v. 5, n. 1, p. 539-549, 2013.
- DAMASCENO, F. S.; BATISTA, R. S. M.; OLIVEIRA, C. F.; ABREU, L. F.; OLIVEIRA, M. S. P. Caracterização físico-química da polpa de tucumãs do BAG da Embrapa Amazônia Oriental (*Astrocaryum vulgare* Mart). In: ENCONTRO NACIONAL SOBRE METODOLOGIAS DE LABORATÓRIO, 13., 2008, Belém. *Anais...* Belém: Embrapa Amazônia Oriental, 2008. p. 121-123.
- FERNANDES, H. R.; SILVA, J. S.; PINA, D. M. M.; ROSÁRIO, L. P. C.; COSTA, R. G.; SOUSA, E. M. P.; RODRIGUES-FILHO, J. M.; OLIVEIRA, M. S. P.; PARACAMPO, N. E. N. P.; ABREU, L. F. Caracterização da polpa e do óleo de frutos da palmeira tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). In: SIMPÓSIO LATINO AMERICANO DE CIÊNCIA DE ALIMENTOS, 7., 2007, Campinas. *Anais...* Campinas: EMBRAPA Amazônia Oriental, 2007. 1 p.
- FERREIRA, E. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S.; SILVEIRA, C. S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído do Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). *Alimentação e Nutrição*, Araraquara, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2008.
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS - FAO. Human vitamin and mineral requirements. Report 7th Joint FAO/OMS Expert Consultation Bangkok. Rome: FAO, 2001.
- GAMÉZ-MEZA, N.; NORIEGA-RODRIGUEZ, J. A.; MEDINA-JUAREZ, L.; ORTEGA-GARCIA, J.; CAZAREZ-CASANOVA, R.; ÁNGULO-GUERRENO, O. Antioxidant activity in soybean oil of extracts from Thompson grape bagasse. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, v. 76, n. 12, p. 1445-1447, 1999.

- HAMACEK, F. R.; MOREIRA, A. V. B.; MARTINO, H. S. D.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Valor nutricional, caracterização física e físico-química de jenipapo (*Genipa americana* L.) do cerrado de Minas Gerais. *Brazilian Journal of Food and Nutrition*, Araraquara, v. 24, n. 1, p. 73-77, 2013.
- HARTMAN, L.; LAGO, R. C. A. Rapid preparation of fatty acid methyl esters from lipids. *Laboratory Practice*, London, v. 22, n. 1, p. 475-476, 1973.
- IGNAT, I.; VOLF, I.; VALENTIN, I. P. A critical review of methods for characterization of polyphenolic compounds in fruits and vegetables. *Food Chemistry*, Barking, v. 126, n. 4, p. 1821-1835, 2011.
- INSTITUTE OF MEDICINE. Dietary reference intakes (DRIs) for energy, carbohydrate, fiber, fat, fatty acids, cholesterol, protein, and amino acids. Washington: National Academy Press, 2005.
- INSTITUTO ADOLFO LUTZ - IAL. Métodos físicos e químicos para análise de alimentos. Normas Analíticas. 5. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008.
- KLINK, C. A.; MACHADO, R. B. A conservação do cerrado brasileiro. *Megadiversidade*, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 147-155, 2005.
- LEE, S. K.; KADER, A. A. Preharvest and postharvest factors influencing vitamin c content of horticultura crops. *Postharvest Biology and Technology*, New York, v. 20, n. 3, p. 207-220, 2000.
- LIMA, R. R.; TRASSATO, R. C.; COELHO, V. O. tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) principais características e potencialidade agroindustrial. Belém: EMBRAPA-CPATU, 1986. 27 p. (Boletim de pesquisa, 75).
- MELO, E. A.; MACIEL, M. I. S.; LIMA, V. L. A. G.; LEAL, F. L. L.; CAETANO, A. C. S.; NASCIMENTO, R. J. Capacidade antioxidante de hortaliças usualmente consumidas. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 26, n. 3, p. 639-644, 2006.
- MORAIS, L. R. B.; GUTJAHR, E. *Química de oleaginosas, valorização da biodiversidade Amazônica*. Brasília, DF: GTZ, 2012. 83 p.
- MOUSSA, F.; KAHN, F. Uso y potencial económico de dos palmas, *Astrocaryum aculeatum* Meyer y *A. vulgare* Martius, em la Amazonia brasileña. In: RIOS, M.; PEDERSEN, H. B. (Ed.). *Uso y manejo de recursos vegetales*. Quito: Abya-Yala, 1997, p. 101-116.
- OLIVEIRA, M. do S. P. de; ABREU, L. F.; FLORES, B. C. Seleção de tucumanzeiros (*Astrocaryum vulgare* Mart.) para teor de óleo no mesocarpo. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MELHORAMENTO DE PLANTAS, 2013, Uberlândia. *Anais...* Viçosa, MG: SBMP, 2013. p. 1064-1067.
- OLIVEIRA, M. do S. P. de; COUTURIER, G.; BESERRA, P. Biologia da polinização da palmeira Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.) em Belém-Pará, Brasil. *Acta Botanica Brasilica*, São Paulo, v. 17, n. 3, p. 343-353, 2003.
- PEREIRA, J. C. Nutrição e alimentação, parte específica, sais minerais (macro e microelementos). *Boletim do Criadouro Campo das Caviúnas*, Cruzeiro, v. 1, n. 18, p. 1-27, 2005.
- POUSSEL, E.; MERMET, J. M. Emission spectrometers: 1995 analytical figures of merit. *Applied Spectroscopy*, Villeurbanne Cedex, France, v. 49, n. 10, p. 12A-18A, 1995.
- 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 *Acromia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, p. 90-94, 2008. Suplemento.
- ROCHA, M. S.; FIGUEIREDO, R. W.; ARAÚJO, M. A. M.; MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R. Caracterização físico-química e atividade antioxidante (*in vitro*) de frutos do cerrado piauiense. *Revista Brasileira de Fruticultura*, Cruz das Almas, v. 35, n. 4, p. 933-941, 2013.
- ROESLER, R.; MALTA, L. G.; CARRASCO, L. C.; HOLANDA, R. B.; SOUSA, C. A. S.; PASTORE, G. M. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.
- RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F.; MANCINI-FILHO, J. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, Barking, v. 121, n. 1, p. 996-1002, 2010.
- SANTOS, A. C. A.; MARQUES, M. M. P.; SOARES, A. K. O.; FARIAS, L. M.; FERREIRA, A. K. A.; CARVALHO, M. L. Potencial antioxidante de antocianinas em fontes alimentares: revisão sistemática. *Revista Interdisciplinar*, Teresina, v. 7, n. 3, p. 149-156, 2014.
- SANTOS, M. F. G.; ALVES, R. E.; RUÍZ-MÉNDEZ, M. V. Minor components in oils obtained from Amazonian palm fruits. *Grasas y Aceites*, Sevilla, v. 64, n. 5, p. 531-536, 2013.
- SANTOS, M. F. G.; MAMEDE, R. V. S.; RUFINO, M. S. M.; BRITO, E. D.; ALVES, R. E. Amazonian native palm fruits as sources of antioxidant bioactive compounds. *Antioxidants*, Switzerland, v. 4, n. 1, p. 591-602, 2015.

- SHANLEY, P. *Frutíferas e plantas úteis na vida amazônica*. Belém: CIFOR, Imazon, 2005.
- SILVA, A. M. L.; MARTINS, B. A.; DEUS, T. N. Avaliação do teor de ácido ascórbico em frutos do cerrado durante o amadurecimento e congelamento. *Estudos*, Goiânia, v. 36, n. 11/12, p. 1159-1169, 2009.
- SIMÕES, D. L. V. *Composição nutricional e elaboração do biscoito e da barra de cereal do fruto de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.)*. 2010. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar) - Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade Nova de Lisboa, Caparica.
- SWAIN, T.; HILLIS, W. E. The phenolics constituents of *prunus domestica*: the quantitative analysis of phenolic constituents. *Journal of Food Science and Agriculture*, London, v. 10, n. 1, p. 63-68, 1959.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Iron deficiency anemia: assessment, prevention and control - a guide for programme managers. Geneva: WHO, 2001.
- YUYAMA, L. K. O.; AGUIAR, J. P. L.; TEIXEIRA, A. O.; LOPES, T. M.; YUYAMA, K.; FÁVARO, D. I. T.; VASCONCELLOS, M. B. Polpa e casca de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart.): quais os constituintes nutricionais? In: 8º CONGRESSO NACIONAL DA SBAN - NUTRIÇÃO E ALIMENTAÇÃO NA ERA PÓS GENOMA, 30., 2005, São Paulo. Anais... São Paulo, SP: Nutrire: Revista Sociedade Brasileira de Alimentos e Nutrição, 2005. p. 332.
- YUYAMA, L. K. O.; MAEDA, R. N.; PANTOJA, L.; AGUIAR, J. P. L.; MARINHO, H. A. Processamento e avaliação da vida de prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 28, n. 2, p. 408-412, 2008.
- ZIMMERMANN, A. M.; KIRSTEN, V. R. Alimentos com função antioxidantes em doenças crônicas: uma abordagem clínica. *Ciências da Saúde*, Santa Maria, v. 9, n. 1, p. 51-68, 2008.

5.2 Testes de toxicidade

Os resultados desse experimento estão apresentados a seguir, na forma de artigo, intitulado: “Evaluation of acute and subacute (28 days) oral toxicity of the flour bark and pulp of tucuma (*Astrocaryum huaimi* Mart.) in mice”, a ser submetido ao periódico Drug and Chemical Toxicology, qualis/CAPES A4, fator de impacto: 1,946.

Evaluation of acute and subacute (28 days) oral toxicity of the flour bark and pulp of tucuma (*Astrocaryum huaimi* Mart.) in mice

Mirelly Marques Romeiro Santos^{a*}, Andressa Carolina Farias Pereira Subtil Cavalcante^b, Luane Aparecida do Amaral^a, Gabriel Henrique Oliveira de Souza^b, Luciane Candeloro Portugal^c, Bárbara Suzuki dos Santos^c, Felipe Francisco Bittencourt Junior^d, Rafael Souza Maris^d, Antonio Carlos Duenhas Monreal^e, Rodrigo Juliano de Oliveira^e, Elisvânia Freitas dos Santos^a, Priscila Aiko Hiane^a

^a Program in Health and Development in the Mid-western Region, Federal University of Mato Grosso do Sul, 79.070-900, Campo Grande, MS, Brazil.

^b School of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Federal University of Mato Grosso do Sul, 79.070-900, Campo Grande, MS, Brazil.

^c Histology Laboratory, Institute of Biology, Federal University of Mato Grosso do Sul, 79.070-900, Campo Grande, MS, Brazil.

^d Laboratory of Clinical Analysis, University Center of Grande Dourados, 79824-010 Dourados, MS, Brazil.

^e Center for Studies on Stem Cells, Cell Therapy and Toxicological Genetics, Maria Aparecida Pedrossian University Hospital, 79080-190, Campo Grande, MS, Brazil.

***Correspondent Author:** Mirelly Marques Romeiro Santos, Federal University of Mato Grosso do Sul - UFMS, Zip code: 79900-000, Campo Grande, MS, Brazil CEP: 79079-900, Campo Grande, MS, Brazil. Phone: + 55 (67)99988-6640; e-mail: mirellymrsantos@gmail.com.

Abstract: To use natural products in the formulation of new medicines or even for human consumption, it is necessary to carry out toxicity tests for safety evaluation. The objective of the present study was to evaluate the toxicological profile of the flour bark and pulp of tucuma (*Astrocaryum huaimi* Mart.) (FT) through tests of acute and subacute toxicity. Female mice (Swiss) were used for the acute toxicity test (dose 2000 mg/kg), and males and females for subacute toxicity (doses of 250, 500 and 1000 mg/kg FT). In the acute toxicity test, the dose 2000 mg/kg did not cause lethality or behavioral changes in mice, demonstrating that LD50 is higher than this dose. In the subacute toxicity test, none of the doses caused significant changes in the biochemical, hematological, and histopathological parameters of exposed animals. The data obtained suggest that the flour of the bark and pulp of tucumã does not present acute and subacute toxicity in mice.

Keywords: *Astrocaryum huaimi* Mart., tucumã, acute toxicity, subacute toxicity, preclinical study, mice.

Introduction

The Cerrado is one of the richest vegetation in the world and it is located mainly in the north-central region of Brazil (Felfili and Silva Júnior 1993). This biome is known for its biodiversity, which stands out because of the numerous unknown native species that provide fruits with peculiar characteristics, generally considered source of antioxidants (Rosa *et al.* 2016, Almeida *et al.* 2018, Schiassi *et al.* 2018, Moreira-Araújo *et al.* 2019).

Pharmaceutical industries have been developing research with native plants by extracting compounds or molecules to formulate drugs (Pimentel *et al.* 2015.). However, to use natural products in the formulation of new medicines or even for human consumption, it is necessary to carry out toxicity tests for safety evaluation (Traesel *et al.* 2014, Lima *et al.* 2017).

Thus, it is necessary to evaluate the toxicity of native plants and fruits, among them tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.), also known as tucumã-de-Goiás and tucumã-do-brejo. Its fruits are ellipsoid, smooth, orange or yellowish-orange when ripe, with a fibrous and sweet-like mesocarp (Lorenzi *et al.* 2004).

In a recent study carried out by our study group on the evaluation of the composition of the tucumã fruit, it was shown to contain high contents of lipids and fibers, a high content of monounsaturated fatty acids, predominantly oleic fatty acid, the fruits also had significant levels of vitamin C, iron, potassium, and manganese, and a high antioxidant activity (Santos *et al.* 2018). Corroborating with data obtained by other studies (Rodrigues *et al.* 2010, Santos *et al.* 2015, Santos *et al.* 2017). The tucumã fruits present appreciable content of total carotenoids and β -carotene (Santos *et al.* 2015). However, so far there is no scientific report guaranteeing safe consumption of this fruit.

Therefore, the present work is the first study evaluating possible toxic effects from both acute and sub-acute toxicity in mice treated orally with flour of the bark and pulp of tucumã.

Materials and Methods

Botanical Material

The fruits of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) were collected at Fazenda São Sebastião, in the Municipality of Limeira do Oeste, in the state of Minas Gerais, at the geographical coordinates: 19°18'42" S, 50°43'25" W. The plant was identified, and the exsiccate deposited in the UFMS herbarium under the number CGMS 54609 and SISGEN A23EE4B.

The fruit pulping consisted of separating pulp with bark (mesocarp and epicarp), which was subjected to dehydration at 45°C in a forced air circulation oven for a period of 48 hours. The dehydrated material was crushed roughly using a cutter (SIRE[®], Brazil) and later a turrax crusher (TECNAL[®], Brazil). The crushed sample was sieved using 60-mesh sieves in order to achieve particle size uniformity.

The flour from the bark and pulp of the tucumã was suspended in distilled water till prior to administration to the animals (OECD 2008a, OECD 2008b).

The physical-chemical characterization of the bark and pulp of the tucumã was previously carried out by our research group (Santos *et al.* 2018).

Animals

Sixty Swiss mice (35 females and 25 males), eight to 12 weeks old (30 grams $\pm$ 20%) were used. Animals were obtained from the Central Bioterium of the Federal University of Mato Grosso do Sul, Campo Grande, MS, Brazil (OECD 2008a, OECD 2008b, Khandare *et al.* 2016, Branquinho *et al.* 2017).

The animals were kept in polypropylene boxes covered with shavings under controlled environmental conditions: temperature at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity 50-60%, and light/dark cycle of 12 hours. The mice had access to distilled water and commercial feed (Nuvilab[®], Brazil) *ad libitum*.

The experiment was carried out according to the Ethical Principles on Animal Research and approved by the Ethics Committee on Animal Experimentation of the Federal University of Mato Grosso do Sul under opinion no. 894/2017.

Toxicity tests

Acute and subacute toxicity studies were based on the OECD (Organization for Economic Co-operation and Development), Guidelines no. 425 and 407, respectively (OECD 2008a, OECD 2008b).

Acute oral toxicity

The flour of the bark and pulp of tucumã (FT) was administered by oral gavage at a dose of 2000 mg/kg to a female after a three-hour fasting. After 48 hours, the dose was administered to four more females, totaling five treated animals (group: FT 2000 mg/kg). In parallel, five females were treated with distilled water (comparative negative control group). The FT was dissolved in distilled water before gavage (OECD 2008a).

The animals were observed during the first thirty minutes, in the first 24 hours after administration, and daily for 14 days. For the evaluation, the Hippocratic screening of Malone & Robichaud (1962) was used to evaluate conscious state, activity and coordination of the motor system, muscle toning, reflexes, activities in the central nervous system, and activities in the autonomic nervous system. Food consumption was performed every two days (OECD 2008a).

After 14 days of observation, all animals were euthanized with anesthetic agent (isoflurane). The heart, lung, spleen, liver, kidney, uterus, and right ovary were removed, weighed and examined macroscopically.

Subacute oral toxicity

The animals were distributed into five experimental groups containing ten animals per group, five males and five females. Three different doses of FT were given according to the LD50 obtained in the acute toxicity test. The groups were divided as follows: FT 250 mg/kg; FT 500 mg/kg; FT 1000 mg/kg; and control group (negative control), which received only the vehicle (distilled water). All doses of FT and vehicle were daily administered by oral gavage

for 28 consecutive days. To assess reversibility, persistence or delay in the occurrence of toxic effects related to the administration of FT, a satellite group was established, and it received the dose 1000 mg/kg for 28 days, remaining under observation for another 14 days (OECD 2008b).

Body weight and dietary intake were evaluated during the experiment every two days, and behavioral parameters (daily Hippocratic) were evaluated.

For blood collection, the animals were anesthetized with isoflurane (inhalation), and the collection was evaluated in the retro-orbital cavity. The animals were euthanized with anesthetic agent (isoflurane).

The following biochemical parameters were analyzed: total cholesterol, glucose, liver function markers (alanine aminotransferase - ALT, aspartate aminotransferase - AST), renal profile (urea), and protein profile (albumin and total protein) using the Cobas C111 commercial kits (Roche), with the aid of spectrophotometer. The hematological analyses were performed using the KX-21 automation unit (Sysmex) and reviewed in a slide by means of differential counting (leukocytes) and observation of cell morphology/staining (all cell types).

After euthanasia, the heart, lung, kidney, liver, spleen and reproductive organs (testis, epididymis, uterus and ovary) were collected and weighed. The relative weight of organs were calculated as follows: $\text{organ weight/animal weight} \times 100$. Sections of the liver, spleen, heart, lung and kidney were collected and then fixed in buffered formaldehyde 10.0% (pH 7.2) for 24 hours. Then, the samples were processed up to paraffin inclusion, and 5 μm thick sections were obtained, which were stained with hematoxylin/eosin (HE).

For histopathological analyses, the following parameters were examined in the organs: steatosis (fatty degeneration), necrosis, vasodilatation, leukocyte infiltrate, hyaline degeneration, hydropic degeneration, and fibrosis (Pokorska-Śpiwak *et al.* 2017). The images

of the slides were taken using the Leica DM 5500 B microscope, and the software used was the Leica Application Suite, version 38.0 (Build 878).

Statistical analysis

The results were expressed as mean $\pm$ SEM (standard error of the mean). Student's t-test was used to compare groups in the acute toxicity test. Differences between the subacute toxicity test groups were determined by analysis of variance (one-way ANOVA) followed by Dunnett's test. Values of $p < 0.05$ were defined as the level of significance.

Results

Acute oral toxicity

After the acute toxicity test, the dose of 2000 mg/kg FT did not cause the death of any animal. Females of FT-treated mice showed no behavioral changes during the exposure period, nor did they change the dietary intake and weight changes compared to the control group (Table 1). No abnormality was detected in the macroscopic analysis, nor statistical differences in the relative weight of the organs between the treated and control groups (Table 2).

Subacute oral toxicity

There was no occurrence of death among animals during the exposure period in the subacute toxicity test. The animals remained active, responding normally to stimuli, with a normal behavioral pattern for the species and without demonstrating clinical signs associated with toxic effects.

Among the main results, it was observed that only the females who received the dose of 1000 mg / kg FT and the males in the satellite group showed a decrease in feed intake, however the animals (males and females) who received any dose of FT presented decrease in body weight gain (Table 1).

The relative weight of the organs of animals subjected to subacute exposure is shown in Table 2. The organs of male mice presented no statistical difference when compared to the control group. However, the organs of females had an increase in relative weight: liver (1000 mg/kg), kidney (250 and 1000 mg/kg groups) and spleen (250 and 1000 mg/kg groups).

The biochemical parameters are shown in Table 3. Only male animals in the satellite group showed a decrease in HDL values when compared to the control group. Regarding hematological parameters (Table 4), only males presented a significant statistical difference for the erythrocytes (groups 250 and 500 mg/kg), hemoglobin (250 and 500 mg/kg groups), hematocrit (groups 250, 500 mg/kg and satellite), and platelets (500 mg/kg group).

The results of the histopathological analysis are shown in Figure 1. No alterations were observed in the tissues evaluated in animals treated with 1000 mg/kg of FT when compared to animals in the control group.

Discussion

Acute oral toxicity

In this experiment, the adverse effect of FT was first tested to assess the LD50 in mice according to the OECD, protocol 425. According to the results obtained, no signs of morbidity and mortality were observed in female mice that received the 2000 dose mg/kg of FT, during the exposure period. Combining the acute oral toxicity data obtained (Table 1 and 2), the tested flour has a LD50 above 2000 mg/kg (OECD 2008a). Similar results were obtained in studies with other fruits from the Cerrado (Traesel *et al.* 2014, Menegati *et al.* 2016, Traesel *et al.* 2016, Lima *et al.* 2017).

Subacute oral toxicity

To determine the potential side effect associated with FT ingestion at doses of 250, 500, 1000 mg/kg and satellite group, repeated oral toxicity of 28 days in mice was evaluated, according to OECD Guideline 407.

The results of body weight gain observed in Table 1, corroborate with the study by Amaral *et al.* (2021), who observed weight loss in mice that received doses of 250, 500 or 1000 mg / kg of body weight of tucum almond oil (*Bactris Setosa* Mart.). Weight loss in this species may be related to the struggle for dominance and the monotony of the diet. Still, another factor that may be related to weight loss in these animals is the composition of the FT, which has 35% of fibers (which are related to increased satiety). This fact may have caused less intake and, consequently, less weight gain in these groups (Clark and Slavin 2013, Santos *et al.* 2018). According to Spinosa *et al.* (2019), other factors must be associated with weight loss to consider possible poisoning, such as: diarrhea, anorexia, lethargy and elevated levels of liver enzymes. None of these symptoms were observed in the animals in this study. Based on this, it is possible to suggest that FT has the ability to alter the metabolism of mice, leading to weight loss, so FT could be used in the treatment of overweight and obesity.

Although the relative weights of liver (1000 mg/kg group), kidney (250 and 1000 mg/kg groups) and spleen (250 and 1000 mg/kg groups) of women treated with FT showed an increase, however none macroscopic, clinical or biochemical change was detected (Table 3). In addition, the histopathological findings of the liver, spleen, heart, lung and kidney of the treated animals did not show any histological aberrations (Figure 1).

According to Li *et al.* (2010) biochemical and hematological parameters should be taken into account in subacute tests as a way of identifying possible toxic effects of the test substance in the organism or in isolated organs. Although the values found for erythrocytes, hemoglobin, hematocrit (groups 250 and 500 mg/kg) and platelets (group 500 mg/kg) of male animals treated with FT presented values below those observed in the control group, these results were within

the range of normal values for mice (Reis *et al.* 2000; Diniz *et al.* 2006; Vasconcelos *et al.* 2007; Ponte *et al.* 2008; Castello Branco *et al.* 2011; Restel *et al.* 2014; Matida *et al.* 2015). Based on this, the changes were not considered an adverse effect of the test substance.

The same way that the macroscopic analysis showed no alterations when compared with the control group, the histopathological analysis (Figure 1) showed no signs of toxicity such as steatosis, necrosis, vasodilation, leukocyte infiltrate, hyaline degeneration, hydropic degeneration, and fibrosis in the tissues of the animals that received any of the doses of FT.

The female mice from the satellite group showed an increase in the relative weights of liver and lung, however, as shown in figure 1, no macroscopic and histopathological changes were observed in these organs. Male mice in the satellite group, on the other hand, had lower feed intake, reduced hemoglobin and a lower value for HDL, however the hemoglobin and HDL values agree with the values found in the literature (Diniz *et al.* 2006; Spinelli *et al.* 2012). It is noteworthy that the satellite group was observed for 14 days, and during this period the FT supplementation was not performed. These results can be attributed to intraspecies variability (Spinelli *et al.* 2012) and were not attributed to a late adverse effect related to the test substance.

The results obtained in the present study corroborate the findings in other studies of acute and subacute oral toxicity (Tabarraei *et al.* 2019, Ebbo *et al.* 2020, Kpemissi *et al.* 2020).

In view of all data presented in the present study, the flour of the bark and pulp of tucumã can be considered safe, as well as other fruits of the Cerrado already evaluated: bocaiuva (*Acrocomia aculeata*), Cerrado quince (*Alibertia edulis*), pequi (*Caryocar brasiliense*), bacuri (*Attalea phalerata*), and guavira (*Campomanesia adamantium*) (Traesel *et al.* 2014, Menegati *et al.* 2016, Traesel *et al.* 2016, Lima *et al.* 2017, Souza *et al.* 2017).

This research is the first to evaluate the acute and subacute toxicological profile of the flour of bark and pulp of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.). It demonstrated a safe profile for

use. The present study also provides information for future analyses on the development of new food and pharmaceutical products.

Conclusion

The acute oral toxicological test of FT showed, the LD50 value may be considered to be more than 2000 mg/kg body weight. According to the findings FT did not cause lethality or changes clinical signs, body weight, food consumption, tissue/organ weigh, hematological, biochemical and histological parameters examination in mice treated with FT at oral doses of 250, 500, and 1000 mg/kg for 28 days. However, future research should investigate benefits effects of flour of the bark and pulp of tucumã.

Author contributions

Study conception and design: MMRS, ACFPSC, LAA, GHOS, ACDM and RJO; Data analysis: EFS and PAH; Histopathological examinations: LCP and BSS; Biochemical and hematological analyses: FFBJ and RSM; Manuscript writing: MMRS, EFS and PAH.

Disclosure statement

No potential conflict of interest was reported by the author(s).

Funding

The present study was carried out with the support of the Coordination of Improvement of Higher Education Personnel - Brazil - CAPES) (Financing Code 001) and Financial Support of the Foundation for Support to the Development of Education, Science and Technology of the State of Mato Grosso do Sul - FUNDECT (number 10/2015).

Data availability statement

All data and materials are available upon request.

References

- Almeida, A.B., et al., 2018. Assessment of chemical and bioactive properties of native fruits from the Brazilian Cerrado. *Nutrition & Food Science*, 49 (3), 381-392.
- Amaral et al., 2021. Acute and subacute (28 days) oral toxicity studies of tucum almond oil (*Bactris Setosa* Mart.) in mice. *Drug and Chemical Toxicology*, 13 (1), 1-7.
- Branquinho, L.S., et al., 2017. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from *Piper glabratum* leaves. *Journal of Ethnopharmacology*, 198, 372–378.
- Castello Branco, A.C.S., et al., 2011. Parâmetros bioquímicos e hematológicos de ratos Wistar e camundongos Swiss do biotério professor Thomas George. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 15 (2), 209-214.
- Clark, M.J., and Slavin, J.L., 2013. The effect of fiber on satiety and food intake: a systematic review. *Journal of the American College of Nutrition*, 32 (3), 200-211.
- Diniz, M.F.F.M. et al., 2006. Padronização dos Parâmetros Hematológicos e Bioquímicos de Camundongos Swiss e Ratos Wistar. *Revista Brasileira de Ciências da Saúde*, 10 (2), 171-176.
- Ebbo, A.A., 2020. Acute and sub-chronic toxicity evaluation of the crude methanolic extract of *Diospyros mespiliformis* hochst ex a. Dc (ebenaceae) and its fractions *Toxicology Reports*, 7, 1138-1144.
- Felfili, J.M. and Silva Júnior, M.C., 1993. A comparative study of cerrado (sensu stricto) vegetation in Central Brazil. *Journal of Tropical Ecology*, 9 (3), 277-289.
- Kandhare, A.D., et al., 2016. Acute and repeated doses (28 days) oral toxicity study of Vicenin-1, a flavonoid glycoside isolated from fenugreek seeds in laboratory mice. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 81, 522–531.

- Kpemissi, M., et al., 2020. Acute and subchronic oral toxicity assessments of *Combretum micranthum* (Combretaceae) in Wistar rats. *Toxicology Reports*, 7, 162-168.
- Li, X., et al., 2010. Acute and subacute toxicity of ethanol extracts from *Salvia przewalskii* Maxim in rodents. *Journal of Ethnopharmacology*, 131 (1), 110-115.
- Lima, F.F., et al., 2017. Acute and subacute oral toxicity assessment of the oil extracted from *Attalea phalerata* Mart ex Spreng. pulp fruit in rats. *Food Research International*, 91 (), 11-17.
- Lorenzi, H., et al., 2004. *Palmeiras brasileiras exóticas e cultivadas*. São Paulo, Brazil: Plantarum.
- Malone, M.H., and Robichaud, R.C., 1962. A Hippocratic screen for pure or crude drug materials. *Llordya*, 25 (4), 320–331.
- Matida, E.T., 2015. Determinação de parâmetros bioquímicos e hematológicos em camundongos (*Mus musculus*) do biotério central da UFMS. *Revista da Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório*, 3 (1), 30-35.
- Menegati, S.E.L.T., et al., 2016. Acute and subacute toxicity of the aqueous extract of *Alibertia edulis* (Rich.) A. Rich. ex DC. in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 194, 1096-1102.
- Moreira-Araújo, R.S., et al., 2019. Bioactive compounds and antioxidant activity three fruit species from the Brazilian Cerrado. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 41 (3), 1-8.
- OECD – Organization for Economic Cooperation and Development, 2008a. *Test Guideline 425: acute oral toxicity - up-and-down-procedure. Guidelines for testing of chemical*. Paris, France: OECD Publishing.
- OECD – Organization for Economic Cooperation and Development, 2008b. *Test Guideline 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents. Guidelines for testing of chemical*. Paris, France: OECD Publishing.

Pimentel, V., et al., 2015. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança?. *Revista do BNDES*, 43, 41-89.

Pokorska-Śpiwak, M., et al., 2017. Novel serum biomarkers modified by the body mass index z-score for the detection of liver fibrosis and steatosis in children with chronic hepatitis C. *BMC Infectious Diseases*, 17 (361), 1-7.

Ponte, F.L.R., et al., 2008. Bee-honey, propolis and Eucalyptus globulus extract: Preclinical toxicity study in Rodents. *Pharmacognosy Magazine*, 4 (16), 278-286.

Reis, C.M.F. et al., 2000. Atividade antiinflamatória, antiúlcera gástrica e toxicidade subcrônica do extrato etanólico de própolis. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 9-10 (1), 43-52.

Restel, T.I., et al., 2014. Hematology of Swiss mice (*Mus musculus*) of both genders and different ages. *Acta Cirúrgica Brasileira*, 29 (5), 306-312

Rodrigues, A.M.C., et al., 2010. Fatty acids profiles and tocoferol contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucumã (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 21 (10), 2000-2004.

Rosa, F.R., et al., 2016. Phytochemical Compounds and Antioxidant Capacity of Tucum-Do-Cerrado (*Bactris setosa* Mart), Brazil's Native Fruit. *Nutrients*, 8 (3), 1-17.

Santos, M.F.G., et al., 2015. Carotenoid composition in oils obtained from palm fruits from the Brazilian Amazon. *Grasas y Aceites*, 66 (3), 1-8.

Santos, M.F.G., et al., 2017. Quality characteristics of fruits and oils of palms native to the Brazilian Amazon. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 39, 1-6.

Santos, M.M.R., et al., 2018. Physical-chemical, nutritional and antioxidant properties of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) fruits. *Semina: Ciências Agrárias*, 39 (4), 1517-1532.

- Schiassi, M.C.E.V., et al., 2018. Fruits from the Brazilian Cerrado region: Physico-chemical characterization, bioactive compounds, antioxidant activities, and sensory evaluation. *Food Chemistry*, 245, 305-311.
- Souza, J.C., et al. 2017. Toxicological analysis and antihyperalgesic, antidepressant, and anti-inflammatory effects of *Campomanesia adamantium* fruit barks. *Nutritional Neuroscience*, 20 (1), 23-31.
- Spinelli, M.O., et al., 2012. Perfil bioquímico dos animais de laboratório do biotério da faculdade de medicina da USP. *RESBCAL*, 1 (1), 76-81.
- Spinosa, H.D.S., Górnaiak, S.L., and Palermo-Neto, J., 2019. *Toxicologia aplicada à medicina veterinária*. Barueri, Brazil: Manole.
- Tabarraei, H., et al., 2019. Evaluation of the acute and sub-acute toxicity of the black caraway seed essential oil in Wistar rats. *Toxicology Reports*, 6, 869-874.
- Traesel, G.K., et al., 2014. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 74, 320-25.
- Traesel, G.K., et al., 2016. Oral acute and subchronic toxicity studies of the oil extracted from pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.) pulp in rats. *Food and Chemical Toxicology*, 97, 224-231.
- Vasconcelos, T.H.C. et al., 2007. Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae). *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 17 (4), 583-591.

Table 1

Weight gain and feed intake of mice observed for 14 days after a single exposure to the flour of the bark and pulp of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) in acute toxicity test and orally treated for 28 days

	Acute toxicity		Subacute toxicity				
	Control	2000 mg/kg	Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satellite
Female							
Initial Weight (g)	28.70±1.40	28.80±1.11	29.10±1.11	29.10±0.90	28.60±1.15	28.60±0.58	29.10±1.10
Final Weight (g)	30.50±1.25	30.70±1.25	31.00±1.44	28.20±0.82	27.50±0.96	26.40±0.51*	28.90±1.01
Weight gain (%)	6.64±1.95	6.45±1.00	5.25±5.03	-2.72±4.03	-3.64±2.39	-7.52±2.79	-4.92±1.19
Feed consumption (g/day)	5.23±0.22	5.50±0.30	5.04±0.23	4.07±0.40	3.70±0.42	3.24±0.62*	3.72±0.40
Male							
Initial Weight (g)			38.20±2.63	39.17±2.06	42.25±1.37	40.92±2.03	41.40±1.82
Final Weight (g)			26.57±1.62	26.48±1.38	28.85±1.13	28.37±0.57	27.12±1.43
Weight gain (%)			-30.22±2.11	-32.02±1.08	-31.62±0.80	-26.12±2.64	-33.97±4.45
Feed consumption (g/day)			6.39±1.6	5.27±0.22	5.53±0.15	5.55±0.12	3.54±0.53*

Values expressed as mean ± standard error of the mean. n=5/acute toxicity group, and n=10/subacute toxicity group. Acute toxicity: Student *t*, and subacute toxicity: Anova-Dunnett (comparison to control group). * level of significance $p < 0.05$.

Table 2Relative organ weight (g/100 g body weight) of mice treated orally with the flour of bark and pulp of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.)

	Acute toxicity		Subacute toxicity				
	Control	2000 mg/kg	Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satellite
Female							
Liver	5.80±0.21	6.09±0.45	4.33±0.15	4.76±0.14	4.91±0.18	5.37±0.16*	5.45±0.10*
Kidney	0.76±0.05	0.66±0.04	0.44±0.02	0.58±0.02*	0.53±0.02	0.54±0.03*	0.49±0.05
Spleen	0.63±0.04	0.75±0.09	0.70±0.04	1.00±0.08*	0.92±0.05	0.98±0.07*	0.93±0.08
Heart	0.51±0.02	0.47±0.03	0.38±0.02	0.46±0.03	0.45±0.02	0.44±0.02	0.38±0.02
Lung	0.72±0.05	0.71±0.06	0.50±0.04	0.74±0.07	0.72±0.02	0.76±0.05	1.04±0.31*
Uterus	0.23±0.03	0.17±0.02	0.13±0.03	0.23±0.03	0.12±0.01	0.16±0.03	0.19±0.04
Ovary	0.06±0.01	0.05±0.00	0.03±0.00	0.05±0.00	0.04±0.00	0.06±0.01	0.03±0.02
Male							
Liver			6.24±0.31	5.68±0.19	5.57±0.13	6.45±0.10	7.03±0.54
Kidney			0.85±0.03	0.96±0.06	0.80±0.03	0.97±0.05	0.94±0.15
Spleen			0.85±0.10	0.79±0.10	0.96±0.16	0.89±0.10	0.65±0.03
Heart			0.68±0.02	0.65±0.02	0.58±0.04	0.67±0.02	0.79±0.06
Lung			1.02±0.14	0.85±0.03	0.77±0.04	0.86±0.07	1.06±0.10
Testicle			0.35±0.04	0.41±0.05	0.34±0.02	0.40±0.04	0.38±0.01
Epididymis			0.07±0.01	0.08±0.01	0.05±0.01	0.08±0.00	0.08±0.01

Values expressed as mean ± standard error of the mean. n=5/acute toxicity group, and n=10/subacute toxicity group. Acute toxicity: Student *t* and subacute toxicity: Anova-Dunnett (comparison to control group). * level of significance $p < 0.05$.

Table 3Biochemical parameters of mice treated orally with flour of bark and pulp of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.)

	Subacute toxicity				
	Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satellite
Females					
Aspartate aminotransferase (U/L)	67.35±9.33	92.70±19.17	68.07±0.61	71.24±8.65	79.95±11.45
Alanine aminotransferase (U/L)	47.35±4.56	51.94±10.77	49.12±4.60	43.02±7.60	42.75±3.35
Total protein (g/dL)	54.95±1.33	62.15±8.61	64.68±11.02	66.43±6.93	48.50±1.10
Albumin (g/dL)	38.65±1.01	41.38±5.58	44.58±8.08	45.57±4.20	37.71±4.97
Serum urea (mg/dL)	39.88±1.14	29.06±2.77	38.18±3.74	39.64±4.08	48.23±4.96
Glucose (mg/dL)	162.40±7.24	313.10±101.90	147.60±24.26	198.20±60.46	171.80±5.65
Cholesterol (mg/dL)	67.03±0.84	82.95±8.06	74.58±9.81	82.03±12.30	74.38±6.33
HDL cholesterol (mg/dL)	80.78±7.65	86.25±9.36	70.97±9.96	88.01±15.30	83.66±11.14
Males					
Aspartate aminotransferase (U/L)	78.18±3.41	58.52±9.16	65.76±9.13	89.50±15.35	75.30±9.91
Alanine aminotransferase (U/L)	35.25±5.07	35.48±5.97	38.70±4.74	46.37±9.52	42.73±1.70
Total protein (g/dL)	50.82±3.52	56.78±3.85	53.76±2.29	55.87±2.43	44.35±4.79
Albumin (g/dL)	37.02±1.86	39.43±1.88	35.59±1.48	37.71±1.66	30.79±3.60
Serum urea (mg/dL)	49.58±5.67	39.98±2.60	45.02±3.22	44.30±4.21	44.75±7.55
Glucose (mg/dL)	156.20±23.86	156.70±6.17	163.90±23.21	179.50±32.49	173.40±26.22
Cholesterol (mg/dL)	124.60±11.74	150.30±9.30	136.40±8.78	156.20±22.52	113.11±10.53
HDL cholesterol (mg/dL)	119.40±11.27	149.60±9.09	138.3±7.41	156.00±22.62	59.98±10.56*

Values expressed as mean ± standard error of the mean. n=10/subacute toxicity group. Anova-Dunnnett (comparison with the control group). * level of significance p<0.05.

Table 4Hematological parameters of mice treated orally with flour of bark and pulp of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.)

	Subacute toxicity				
	Control	250 mg/kg	500 mg/kg	1000 mg/kg	Satellite
Females					
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	8.18 $\pm$ 1.94	6.18 $\pm$ 0.59	6.92 $\pm$ 1.57	5.46 $\pm$ 0.76	7.06 $\pm$ 1.75
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{L}$)	5.72 $\pm$ 1.08	5.32 $\pm$ 0.25	5.35 $\pm$ 1.35	4.73 $\pm$ 0.13	4.19 $\pm$ 0.55
Hemoglobin (g/dL)	9.18 $\pm$ 1.83	8.64 $\pm$ 0.46	8.62 $\pm$ 2.05	7.62 $\pm$ 0.23	6.50 $\pm$ 1.07
Hematocrit (%)	29.95 $\pm$ 5.94	28.30 $\pm$ 1.38	27.64 $\pm$ 7.03	24.30 $\pm$ 0.77	22.32 $\pm$ 3.07
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	416.80 $\pm$ 190.00	513.60 $\pm$ 83.55	196.50 $\pm$ 70.73	426.00 $\pm$ 140.00	745.80 $\pm$ 209.60
Neutrophils (%)	13.25 $\pm$ 1.70	11.84 $\pm$ 1.18	14.80 $\pm$ 2.52	12.96 $\pm$ 3.84	13.84 $\pm$ 2.57
Lymphocytes (%)	82.88 $\pm$ 2.11	84.86 $\pm$ 1.63	80.66 $\pm$ 3.03	82.72 $\pm$ 4.56	83.93 $\pm$ 0.70
Monocytes (%)	2.75 $\pm$ 0.63	2.20 $\pm$ 0.49	3.54 $\pm$ 0.78	3.40 $\pm$ 0.75	4.20 $\pm$ 0.74
Eosinophils (%)	1.13 $\pm$ 0.24	0.90 $\pm$ 0.04	1.00 $\pm$ 0.00	0.92 $\pm$ 0.14	0.96 $\pm$ 0.05
Males					
Leukocytes ($10^3/\mu\text{L}$)	4.46 $\pm$ 0.55	4.04 $\pm$ 1.01	3.35 $\pm$ 0.57	4.80 $\pm$ 0.88	5.60 $\pm$ 1.52
Erythrocytes ($10^6/\mu\text{L}$)	8.32 $\pm$ 0.16	6.15 $\pm$ 0.57*	5.95 $\pm$ 0.48*	8.43 $\pm$ 0.70	7.28 $\pm$ 0.17
Hemoglobin (g/dL)	12.32 $\pm$ 0.34	8.52 $\pm$ 0.47*	8.35 $\pm$ 0.62*	12.15 $\pm$ 0.82	10.22 $\pm$ 0.42*
Hematocrit (%)	40.93 $\pm$ 0.47	28.58 $\pm$ 0.95*	29.30 $\pm$ 2.36*	41.30 $\pm$ 3.39	36.74 $\pm$ 1.14
Platelets ($10^3/\mu\text{L}$)	844.20 $\pm$ 96.93	479.60 $\pm$ 106.50	345.30 $\pm$ 139.40*	932.00 $\pm$ 238.70	357.00 $\pm$ 103.60
Neutrophils (%)	23.72 $\pm$ 3.37	23.45 $\pm$ 2.05	19.36 $\pm$ 3.05	25.18 $\pm$ 2.53	15.36 $\pm$ 4.06
Lymphocytes (%)	72.68 $\pm$ 3.66	69.14 $\pm$ 3.92	74.83 $\pm$ 3.30	69.05 $\pm$ 2.62	81.46 $\pm$ 4.56
Monocytes (%)	2.60 $\pm$ 0.51	3.00 $\pm$ 0.00	3.00 $\pm$ 0.32	2.00 $\pm$ 0.41	2.34 $\pm$ 0.45
Eosinophils (%)	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00

Values expressed as mean $\pm$ standard error of the mean. n=10/subacute toxicity group. Anova-Dunnett (comparison with the control group). * level of significance $p < 0.05$.

Fig. 1. Histopathological analysis of organs of mice treated with the dose 1000 mg/kg of flour of bark and pulp of tucumã compared to the control. A and B spleen (20x), C and D heart (40x), E and F liver (40x), G and H lung (40x), I and J kidney (40x).

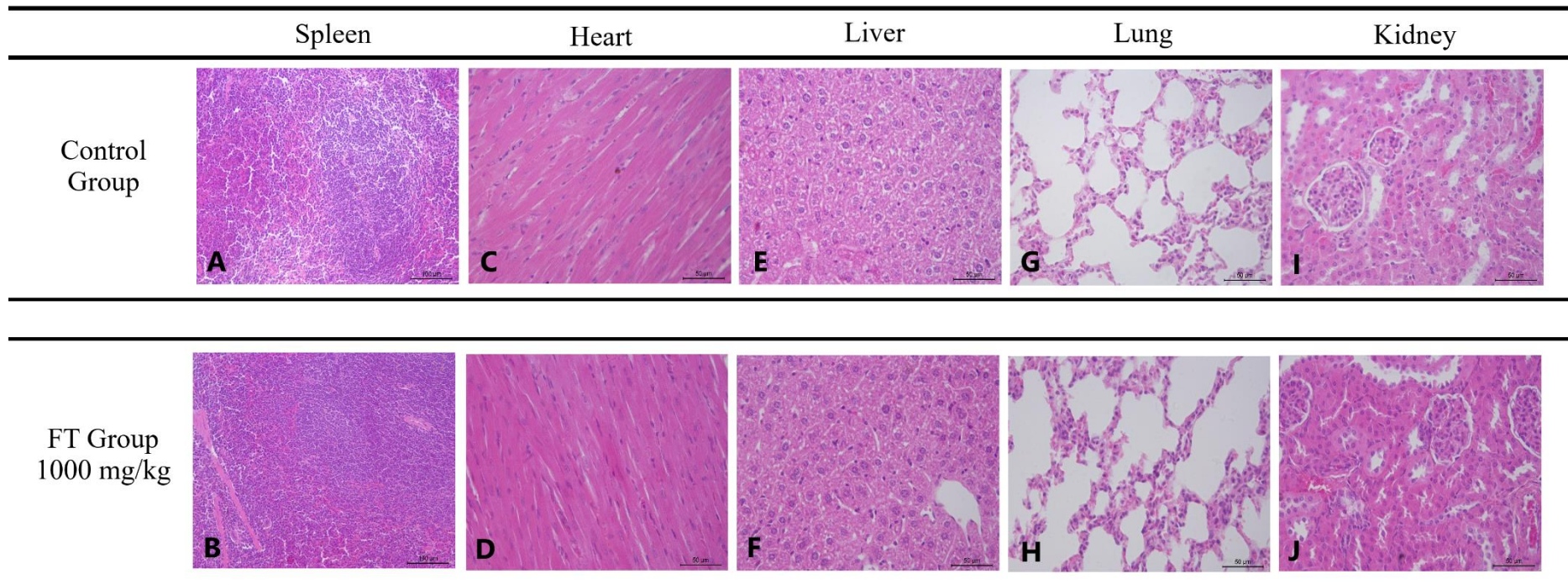


Fig. 1. Histopathological analysis of organs of mice treated with the dose 1000 mg/kg of flour of bark and pulp of tucumã compared to the control. A and B spleen (20x), C and D heart (40x), E and F liver (40x), G and H lung (40x), I and J kidney (40x).

5.3 Modelo de indução de DM2

Os resultados desse experimento estão apresentados a seguir, na forma de artigo, intitulado: “Combination of cafeteria diet with intraperitoneally streptozotocin in rats. A type-2 diabetes model”, publicado no periódico Acta Cirúrgica Brasileira, qualis/CAPES B1, fator de impacto: 1,388.



Combination of cafeteria diet with intraperitoneally streptozotocin in rats. A type-2 diabetes model

Mirelly Marques Romeiro Santos^{1,*} , Andressa Carolina Farias Pereira Subtil Cavalcante² , Luane Aparecida do Amaral¹ , Gabriel Henrique Oliveira de Souza³ , Bárbara Suzuki dos Santos⁴ , Luciane Candelero Portugal⁵ , Felipe Francisco Bittencourt Junior⁶ , Thiago Troquez⁶ , Bruna Paola Murino Rafacho⁷ , Priscila Aiko Hiane⁸ , Elisvânia Freitas dos Santos⁷

1. MSc. Program in Health and Development in the Mid-western Region – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campo Grande (MS), Brazil.
2. Nutritionist. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campo Grande (MS), Brazil.
3. Food Technologist. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campo Grande (MS), Brazil.
4. Pharmacist. Institute of Biology - Histology Laboratory - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campo Grande (MS), Brazil.
5. PhD. Institute of Biology - Histology Laboratory - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campo Grande (MS), Brazil.
6. PhD. Laboratory of Clinical Analysis - Universidade Federal de Grande Dourados – Dourados (MS), Brazil.
7. PhD. Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campo Grande (MS), Brazil.
8. PhD. Program in Health and Development in the Mid-western Region – Universidade Federal do Mato Grosso do Sul - Campo Grande (MS), Brazil.

ABSTRACT

Purpose: To develop a model of induction of type-2 diabetes (DM2) by combining low doses of streptozotocin (STZ) and a cafeteria diet. **Methods:** Forty male Wistar rats (200 g) were allocated into four groups: control (non-diabetic, n = 10); STZ 30 mg/kg (diabetic, n = 10); STZ 35 mg/kg (diabetic, n = 10); and STZ 40 mg/kg (diabetic, n = 10). DM2 was induced with a single intraperitoneal injection of STZ after four weeks of cafeteria diet in the three diabetic groups. All animals were evaluated as for anthropometric, and biochemical analyses, as well as liver, kidney and pancreas histological analyses. **Results:** Lower weight gain, higher water intake, higher Lee index, hyperglycemia and modified total protein, urea, alpha-amylase, as well as insulin resistance, hepatic steatosis, pancreas, and kidney injury were observed in animals treated with 35 and 40 mg/kg of STZ. **Conclusions:** The results show that the experimental model using cafeteria diet associated with 35 mg/kg of STZ is a low-cost model and efficient in order to develop DM2, confirmed by the presence of polydipsia, hyperglycemia, altered biochemical tests, insulin resistance and damages to the liver, pancreas and kidney, which is similar to the disease found in humans.

Key words: Liver. Hyperglycemia. Body Weight. Pancreas. Models, Animal.

* Corresponding author: mirellymrsantos@gmail.com | (55 67)99988-6640

Received: Mar 09, 2021 | Review: May 11, 2021 | Accepted: Jun 08, 2021

Conflict of interest: Nothing to declare.

Research performed at Food Technology Unit, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Food and Nutrition, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS), Campo Grande (MS), Brazil. Part of PhD degree thesis, Postgraduate Program in Health and Development in the Mid-western Region. Tutor: Prof. Dra. Priscila Aiko Hiane.



■ Introduction

In 2016, the estimate was 422 million diabetic adults worldwide. By 2035, the number of adults with diabetes is expected to increase to 592 million¹. The number of people with diabetes increases every year, being the type-2 diabetes (DM2) found in more than 90% of the disease cases².

DM2 is characterized mainly by imperfections in the action and/or secretion of insulin and the regularization of hepatic glucose production. Different organs are involved in DM2 development, including pancreas (with loss of cell mass and function, impaired insulin secretion of beta cell and dysregulated glucagon secretion by the alpha cell), liver (increased hepatic glucose output), skeletal muscle (reduced peripheral glucose uptake and insulin resistance), kidneys (increased glucose reabsorption), brain (increased appetite and lack of satiety), small intestine (increased rate of glucose absorption), and adipose tissue (reduced peripheral glucose uptake and insulin resistance)³.

The major factors that increase the risk of developing DM2 include unhealthy habits, such as sedentary lifestyle, smoking, overweight and obesity, increased consumption of unhealthy diets (containing high levels of red meat and processed meat, refined grains and sweetened beverages), as well as the interaction of genetic and metabolic factors⁴.

The cafeteria diet is a model used in animal experiments to imitate the Western food model, which is highly palatable and has a marked caloric value^{4,5}. This diet is mainly composed of foods rich in saturated fat and refined sugar, such as: sausages, chocolates, cookies, soft drinks, snacks, condensed milk, among other, which are added to a standard diet^{4,6}. This diet model has been shown to be efficient in inducing several metabolic changes: hyperinsulinemia, hyperglycemia, glucose intolerance, increased adiposity, and hepatosteatosis, as well as greater food consumption and increased weight gain in experimental animals^{4,7}.

Cytotoxic drugs used to chemically induce DM in experimental animals have been widely used for studying drugs and prophylactic, metabolic, hormonal, and

morphological factors during and after the induction of the diabetic state⁸. Streptozotocin (STZ) is a particularly toxic agent for beta pancreatic cells. It is widely used to induce diabetes in rats⁹. Low doses of STZ, when associated with a hypercaloric diet, have proven efficient in resembling DM2 in humans¹⁰. Hypercaloric diet leads to increase in adiposity and decrease in insulin efficacy, especially in peripheral tissues¹⁰. However, there is a great variation in STZ doses (25-50 mg/kg)^{9,11,12}. The standardization of an experimental model is the starting point for several studies.

Thus, due to the wide variation among doses used in already published studies and the different environments and behavior of experimental animals, including ecological factors, the aims of the present study were to establish and standardize a DM2-induction model using three different doses of STZ associated with a cafeteria diet in Wistar rats.

■ Methods

Experimental design

The research project was approved by the Ethics Committee (Protocol no. 895/2017) of Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Forty male Wistar rats (approximately 200 g) were obtained from the Central Bioterium of UFMS.

The animals were housed in polypropylene boxes (two animals per box) in controlled environmental conditions: temperature at $22 \pm 2^\circ\text{C}$, relative humidity of 50-60%, light/dark cycle of 12 hours, and control of water intake. The diet was monitored twice a week during the experiment. After diabetes induction, water control was performed four times a week due to polydipsia. For calculations, the difference between the offered quantity and the remaining quantity of food was considered.

Experimental groups and diet

The rats were allocated into a control group (C, n = 10) and three different diabetic groups: 30 mg/kg STZ (STZ30, n = 10), 35 mg/kg STZ (STZ35, n = 10) and 40 mg/kg STZ (STZ40, n = 10), as shown in Fig. 1.

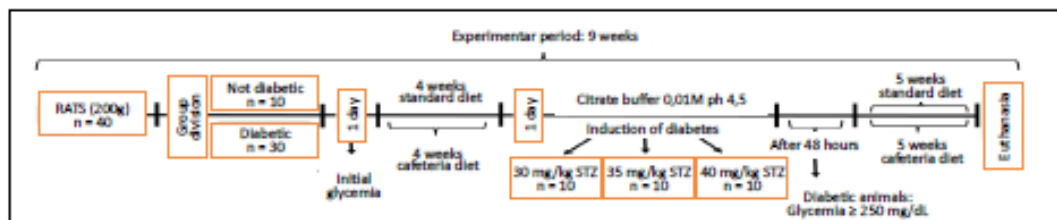


Figure 1 - Study design.

The animals in the control group were fed with commercial chow. The animals in the diabetic groups were fed with cafeteria diet containing 35% commercial chow, 10% lard, 10% peanuts, 10% chocolate powder, 10% chocolate wafer biscuit, and 25% refined sugar, based on Pérez-Echarri et al.¹³, for nine weeks.

The cafeteria diet had the following composition: 11% proteins, 60% carbohydrates, and 21% lipids with an energy content of 4.7 kcal/g, whereas the commercial chow (Nuvilab, Quimtia, Colombo, PR, Brazil) presented 22% proteins, 55% carbohydrates, and 5% lipids with an energy content of 3.6 kcal/g.

Induction of experimental diabetes

After four weeks, fasted animals (8 hours) received an intraperitoneal injection of STZ (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, United States) diluted in sodium citrate buffer (0.01M and pH 4.5) at the doses of 30, 35 or 40 mg/kg (diabetic groups), or sodium citrate buffer (control group). Glycemia was measured after STZ injection (initial glycemia), and the animals were fed 6 hours later. Forty-eight hours after feeding, the animals fasted again for 8 hours, and the final glycemia was obtained using a portable glucometer (Injex Sens II). The animals were considered diabetic when glycemia values were ≥ 250 mg/dL¹⁷.

Insulin tolerance test

Insulin tolerance test was determined four days before the end of the experiment. The test was performed in a fed state. The blood glucose was verified at time 0 (before intraperitoneal insulin administration) using a glucometer (Injex Sens II), through a small incision in the caudal vein. Afterwards, insulin (NovoRapid Penfill) was given intraperitoneally (1.5 IU insulin/kg of body weight), and blood glucose was measured at 5, 10, 12 and 15 minutes, using the adapted procedure of Ayoub et al.¹⁴.

Anthropometric evaluation

Weight gain, length, thoracic and abdominal circumference, and Lee's index, which uses the body weight ratio related to length, were evaluated according to Novelli et al.¹⁵.

Euthanasia and sample collection

After fasting for 8 hours, the animals were anesthetized (inhaling) with isoflurane, and then blood collection was performed at the retro-orbital cavity. Death was confirmed by anesthesia overdose. Blood was centrifuged at 3,500

rpm/15 min to obtain serum. After euthanasia, the retroperitoneal, epididymal and perirenal fats of each animal were completely removed and weighed using an analytical balance for a later comparison among groups¹⁶. The adiposity index (AI) was calculated by the ratio (body fat/final body weight) $\times 100$ ¹⁷. Liver, kidney and pancreas were also collected for histological evaluation.

Biochemical evaluation

The following parameters were determined in the serum: total cholesterol, high-density lipoprotein (HDL), glucose, liver function markers (alanine aminotransferase – ALT, aspartate aminotransferase – AST, alanine aminotransferase), renal parameters (urea, creatinine, and uric acid), protein profile (albumin and total protein) and α -amylase using Cobas C111 of commercial kits (Roche, United States) and spectrophotometry.

Histological analysis

Liver, kidney and pancreas were placed in 10% buffered formalin solution (for fixation) and then kept in 70% alcohol until paraffin embedding. After this, 5- μ m thick sections were obtained. The slides were dewaxed and stained with hematoxylin and eosin. Microscopy (Leica Application Suite, version 4.0) was used for analysis.

The images were captured with $\times 40$ magnification. Histological analyses were based on the parameters of:

- Pancreas: area and number of islets, cellular vacuolization of pancreatic islets, and the exocrine portion;
- Liver: hepatic steatosis and vasocongestion;
- Kidney: renal steatosis and renal tubule hydropic degeneration.

Pancreatic islet area analysis was performed using 20 digital images (TIFF 8-bit color, 3,264 $\times$ 2,448 pixels, $\times 200$ magnification) for each pancreas ($n = 6$ /group). Nikon D3100 photo camera coupled with Zeiss Primo Star microscope was used. The program used to measure islet areas was Image Processing and Analysis in Java (ImageJ). Quantitative analysis of the number of pancreatic islets was performed using Leica DM500 microscope at $\times 50$ magnification. Pancreatic fields were used ($n = 6$ animals/group). Methodology was based on the article by Gomes et al.¹⁸.

Statistical analysis

Data were analyzed by the software GraphPad Prism version 6.0 using analysis of variance (one-way ANOVA) by Tukey's test. Values were considered significant when $p < 0.05$.

Results

Anthropometric parameters, water and food intake

Final weight, weight gain, Lee's index, and water and food intake differed among groups ($p < 0.05$), as shown in Table 1.

Table 1 - Anthropometric parameters, and water and food intake of control and diabetic groups (n=10)*.

	CONTROL M±SEM	30STZ M±SEM	35STZ M±SEM	40STZ M±SEM
Initial body weight (g)	197.90±5.91	198.00±5.84	198.80±3.60	197.60±3.68
Final body weight (g)	410.60±9.73*	353.90±12.71*	327.60±14.28*	320.10±11.42*
Weight gain (g)	212.70±6.54*	155.90±9.00*	128.80±11.67*	122.50±10.01*
TC (cm)	18.03±0.54	18.28±0.25	17.62±0.40	17.89±0.34
AC (cm)	16.23±0.35	16.01±0.27	15.70±0.11	15.32±0.22
Lee's index (g/cm ³)	0.31±0.002*	0.30±0.001*	0.29±0.002*	0.30±0.002*
Chow intake (g/day)	26.45±0.62*	18.52±0.51*	20.53±0.75*	22.85±0.49*
Water intake (mL/day)	39.96±1.30*	41.65±7.32*	71.34±7.63*	84.99±8.22*

*Different letters on the same line indicate significant difference by Tukey's test ($p < 0.05$); STZ: streptozotocin; M: mean; SEM: standard error of the mean; AC: abdominal circumference; TC: thoracic circumference.

Glycemia before and after streptozotocin injection

The results of initial fasting glycemia and 48 hours after STZ injection are presented in Table 2.

Table 2 - Fasting glycemia before and 48 hours after streptozotocin injection of control and diabetic groups (n = 10)*.

Glycemia (mg/dL)	CONTROL M±SEM	30STZ M±SEM	35STZ M±SEM	40STZ M±SEM
Initial	144.20±3.94	154.60±1.65	151.80±3.73	148.00±2.10
48h after STZ	153.60±7.91*	178.50±7.36*	359.90±44.43*	454.60±40.88*

*Different letters on the same line indicate significant difference by Tukey's test ($p < 0.05$); STZ: streptozotocin; M: mean; SEM: standard error of the mean.

Weight of organs and tissues

Table 3 presents the weight of different organs and adipose tissue of the control and experimental groups. Only the values of the pancreas and adiposity index were different between groups ($p < 0.05$).

Table 3 - Weight of organs and adipose tissue of control and diabetic groups (n = 10)*.

	CONTROL M±SEM	30STZ M±SEM	35STZ M±SEM	40STZ M±SEM
Liver (g)	14.56±0.87	14.64±0.49	14.56±0.78	14.40±0.50
Kidney (g)	1.52±0.03	1.39±0.08	1.65±0.11	1.67±0.06
Pancreas (g)	1.61±0.07*	1.31±0.07*	1.23±0.07*	1.30±0.05*
Adipose tissue				
Epididymis (g)	3.95±0.35	4.74±0.52	4.32±0.50	3.91±0.47
Perirenal (g)	1.17±0.11	1.38±0.12	1.00±0.17	1.00±0.19
Retroperitoneal (g)	3.62±0.31	5.11±0.60	3.39±0.74	0.86±0.49
Adiposity index (%)	2.17±0.10*	3.17±0.14*	2.56±0.31*	2.13±0.20*

*Different letters on the same line indicate significant difference by Tukey's test ($p < 0.05$); STZ: streptozotocin; M: mean; SEM: standard error of the mean.

Biochemical evaluation

Table 4 shows the biochemical parameters of the control and experimental groups. Glucose, HDL, total protein, urea, AST, ALT and α -amylase were different among groups.

Table 4 - Biochemical parameters of control and diabetic groups (n = 10)*.

	CONTROL M±SEM	30STZ M±SEM	35STZ M±SEM	40STZ M±SEM
Glucose (mg/dL)	98.83±2.00*	285.70±8.73*	310.80±6.37*	334.30±9.17*
Cholesterol (mg/dL)	51.77±3.45	58.78±4.18	47.57±1.94	48.69±1.67
HDL (mg/dL)	49.08±2.81*	50.02±3.65*	38.60±1.56*	38.88±1.14*
Total protein (g/L)	52.06±1.89*	51.22±2.52*	44.37±1.67*	45.24±1.01*
Creatinine (mg/dL)	0.43±0.03	0.57±0.06	0.49±0.03	0.057±0.05
Albumin (g/L)	42.97±2.15	42.69±2.40	36.19±1.39	38.66±1.29
Uric acid (mg/dL)	0.60±0.02	0.78±0.07	0.66±0.05	0.63±0.05
Urea (mg/dL)	25.34±1.30*	29.01±0.68*	30.34±1.15*	37.85±0.90*
AST (U/L)	41.97±2.06*	70.48±3.76*	85.71±2.31*	94.27±3.10*
ALT (U/L)	30.87±1.67*	62.29±2.34*	72.77±1.81*	82.14±2.88*
α -Amylase (U/L)	407.60±4.73*	589.00±77.90*	797.20±7.39*	887.70±8.03*

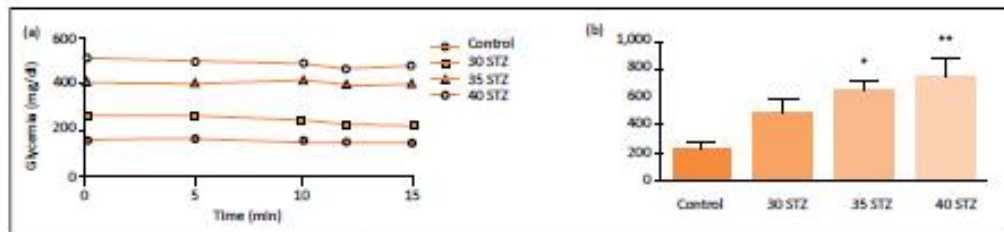
*Different letters on the same line indicate significant difference by Tukey's test ($p < 0.05$); STZ: streptozotocin; M: mean; SEM: standard error of the mean; HDL: high-density lipoprotein; AST: aspartate aminotransferase; ALT: alanine aminotransferase.

Insulin tolerance test

Insulin tolerance test through time (Fig. 2a) and the area under the curve (AUC) (Fig. 2b) were higher in animals treated with 35 and 40 mg/kg STZ ($p < 0.05$).

Histological analysis of liver, pancreas, and kidney

Histological analyses of liver, pancreas, and kidney are presented in Fig. 3. Animals treated with 35 and 40 mg/kg STZ presented greater liver fat deposition (Fig. 3g-j,



* $p < 0.05$ in relation to the control group; ** $p < 0.01$ in relation to the control group. Values are presented as mean $\pm$ standard error of the mean ($n = 10$); STZ: streptozotocin.

Figure 2 - (a) Blood glucose levels in insulin sensitivity test applied at 0, 5, 10, 15 min; (b) area under the curve (AUC) of insulin sensitivity test.

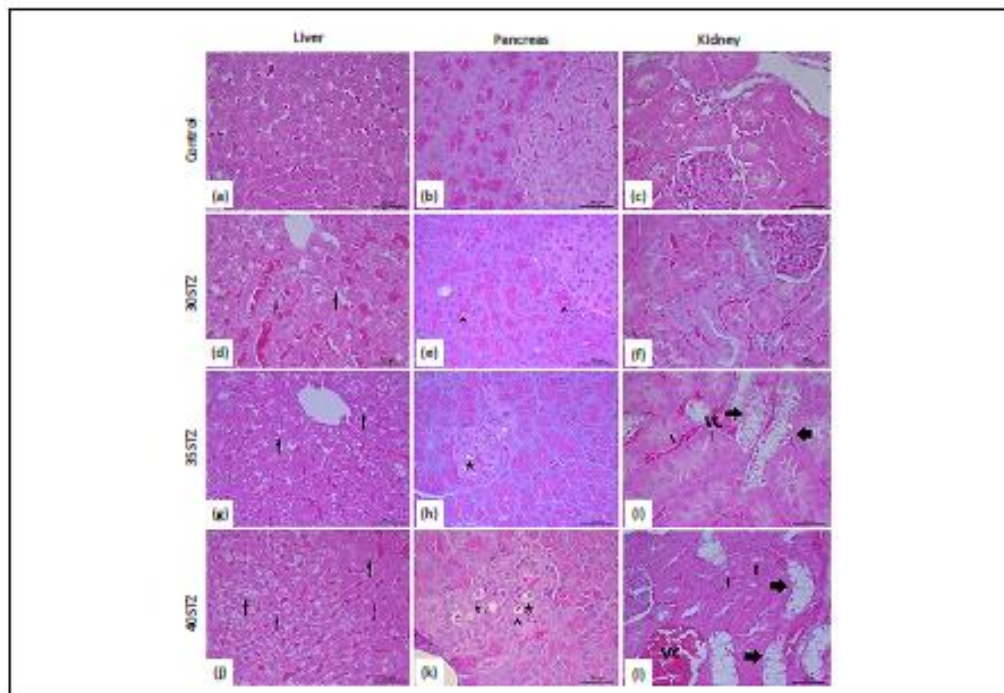


Figure 3 - Effects of cafeteria diet and different doses of STZ on the histopathology of liver, pancreas, and kidney (H&E- Hematoxylin and eosin, $\times 40$). (a) Control group represents liver with standard morphology; (b) Control group represents pancreas with standard morphology; (c) Control group represents kidney with standard morphology; (d) Group 30 mg/kg STZ: liver with mild steatosis (thin arrow); (e) Group 30 mg/kg STZ: pancreatic islets with reduced size and vacuolization (arrowhead) in pancreatic acini; (f) Group 30 mg/kg STZ represents kidney with standard morphology; (g) Group 35 mg/kg STZ: liver with mild steatosis (thin arrow); (h) Group 35 mg/kg STZ: small size pancreatic islets and apoptotic bodies (asterisk) on islet; (i) Group 35 mg/kg STZ: renal tubules with hydropic degeneration (thick arrow) and steatosis (thin arrow). Kidney with vasocongestion; (j) Group 40 mg/kg STZ: liver with moderate steatosis (thin arrow); (k) Group 40 mg/kg STZ: small-sized pancreatic islet and apoptotic bodies (asterisk) on the islet; (l) Group 40 mg/kg STZ: renal tubules with hydropic degeneration (thick arrow), steatosis (thin arrow). Kidney presents vasocongestion.

respectively). The pancreas of the control group presented normal morphology (Fig. 3b), whereas animals in the STZ35 (Fig. 3h) and STZ40 (Fig. 3k) groups showed important changes in pancreatic morphology. The animals that received the doses of 35 and 40 mg/kg STZ presented renal damage (Fig. 3 i-l).

Based on the results presented in Table 5, we can see that the animals treated with 35 and 40 mg/kg STZ showed decrease in the area of pancreatic islets.

Table 5 - Result of areas of pancreatic islets of control and diabetic groups (n = 10)^a.

	CONTROL	30STZ	35STZ	40STZ
	M±SEM	M±SEM	M±SEM	M±SEM
Area islet (mm ²)	28.80±2.26	30.51±2.67	18.01±1.23*	21.03±1.71*
Number of islets	5.8±0.54	4.47±0.27	2.80±0.31*	2.80±0.36*

^aThe analysis of variance (ANOVA) test (one criterion) was used to check statistical difference, and Tukey's test was used to locate the differences; STZ: streptozotocin; M: mean; SEM: standard error of the mean; *control group compared to the other groups; †control group compared to the other groups; *30STZ group compared to the 35STZ and 40STZ groups).

Discussion

Regarding final weight, the animals that received 30, 35 and 40 mg/kg STZ presented reduction of 13.8, 20.2 and 22% in weight in comparison to the control group, which is consistent with literature data¹⁹. Weight loss is a common symptom in untreated, decompensated diabetic²⁰. Due to metabolic dysfunction, tissues cannot absorb glucose; the body creates pathways to obtain energy by increasing gluconeogenesis, lipolysis and ketone production, leading to weight loss²¹.

In the study by Campos *et al.*²², a correlation was observed between higher blood glucose values and lower weight in diabetic animals, indicating that the body's inability to use glucose due to insulin resistance leads to a catabolic condition.

The lower weight gain observed in STZ-treated animals may also be related to a decreased food intake (Table 1). The higher food intake in animals fed with the control diet is corroborated by Hariri *et al.*²³. Animals fed with high-fat chow presented lower food intake when compared to animals fed with commercial chow. Rosado and Monteiro²⁴ affirm that this finding can be explained by the release of the satiety cholecystokinin hormone after the intake of foods rich in lipids. Our findings also show that the lower weight gain in diabetic animals influenced Lee's index

as well. Lee's index may reflect the degree of obesity²⁵. However, this calculation does not evaluate the percentage of fat. Therefore, it is not possible to state that the animals in the control group are obese.

Animals in the 35 and 40 mg/kg STZ groups presented higher water intake compared to the control group. Our findings are supported by other studies^{25,26} and clinical symptoms found in human patients with DM2: polyuria and polydipsia^{24,27}.

The use of low doses of STZ induces the death of pancreatic beta cells through the alkylation of DNA, leading to a slight impairment of insulin secretion with subsequent hyperglycemia, whereas hyperlipidic diets lead to obesity, insulin resistance and mild hyperglycemia^{28,29}. In the present study, animals treated with 35 and 40 mg/kg of STZ presented a glycemia higher than 250 mg/dL, demonstrating greater efficiency in the induction of experimental DM2, in accordance with Castro *et al.*¹¹. Furthermore, the reduction of islet size was also found by Castro *et al.*¹¹, who evaluated animals treated with 35 mg/kg STZ receiving high-fat diet containing standard chow, peanut, milk chocolate and sweet biscuits at a ratio of 3:2:2:1. Thus, the combination of a low dose of STZ and hyperlipidic diets has shown to be an effective model to simulate the metabolic characteristics of DM2 in humans, like insulin resistance^{8,11}.

STZ-treated groups presented decreased pancreatic mass compared to the control group. This result is similar to the ones obtained by Castro *et al.*¹¹, who observed decrease in the pancreas weight of diabetic animals. This result can be explained by the action of STZ in destroying beta cells of the islets of Langerhans, damaging cellular functionality and, consequently, decreasing the production and insulin release, as well as reducing the size of the islets^{11,30}.

The group treated with 30 mg/kg STZ presented a higher AI compared to the control group. Leopoldo *et al.*³¹ conducted a study comparing obese animals fed with a high-fat diet with a control group (animals fed with a standard diet) and found similar results.

Animals treated with STZ presented higher levels of blood glucose compared to the control group. Increased blood glucose is a common characteristic of uncontrolled diabetes²¹. Magalhães *et al.*³² performed a similar study with a high-fat diet and animals from another bioterium and found that only animals that received the dose of 40 mg/kg presented blood glucose higher than the control animals. In our findings, all STZ doses (30, 35 and 40 mg/kg) presented higher glycemia than the control group, above the reference value for diabetic animals (250 mg/dL)³³.

In DM2, triglyceride levels increase and HDL ones decrease^{32,33}. Animals treated with 35 and 40 mg/kg STZ presented low HDL cholesterol values. Jiao et al.³³ found similar results. This can be attributed to an excess of circulating fatty acids derived from adipose tissue in the liver. With a higher production of fatty acids, there is decrease in insulin sensitivity in muscle tissues³⁴. Adiels et al.³⁵ stated that DM2 and insulin resistance are associated with excess of liver production of very-low-density lipoprotein (VLDL).

A decrease in total proteins was observed in animals that received 35 mg/kg STZ in comparison to the control group, which may indicate hepatic or renal disorder or decompensated diabetes. According to Castaneda et al.³⁶, decompensated DM2 is associated with altered protein profiles in the body, since insulin resistance (as observed in the present study, Fig. 2) may lead to muscle mass loss, which is indicated by the decrease in serum proteins.

The groups treated with 35 and 40 mg/kg STZ presented increased values of urea compared to the control group. High urea levels might suggest renal dysfunction³⁷. Uncontrolled diabetes leads to serious renal damage over time, being one of the main causes of renal failure³. Thus, in our study, the association of low doses of STZ with a cafeteria diet was efficient in simulating deleterious effects on the animals' kidneys, corroborating the observed effects of diabetes in humans.

Animals that received STZ presented higher levels of AST and ALT compared to the control group. In the study by Ulla et al.³⁸, rats fed with high-fat diet displayed high ALT and AST activity in plasma, as well as a fatty liver, compatible with non-alcoholic liver disease associated with high-fat diets and liver oxidative stress. The occurrence of non-alcoholic liver disease is considerably higher in diabetics compared to non-diabetics³⁹.

The α -amylase values in the 35 and 40 mg/kg STZ groups were higher than in the control group (Table 4). A major product of the secretion of pancreas and salivary glands, α -amylase is considered the key enzyme in the digestive system, a prerequisite for the onset of the digestion process⁴⁰. Starch digestion occurs mainly in the small intestine by the action of pancreatic enzymes such as α -amylase, which degrades carbohydrates into oligosaccharides and disaccharides, and by α -glycosidases in the membrane of intestinal cells, which hydrolyze oligo- and disaccharides into monosaccharides⁴⁰. Degradation of dietary starch advances fast and leads to high postprandial hyperglycemia. Amylase is also widely used as a serum marker of pancreatic inflammation⁴⁰.

The faster blood glucose decreases after insulin administration; a greater insulin sensitivity occurs⁴¹. In

our study, there was increase in serum glucose levels in the groups receiving STZ, as expected (Fig. 2a). By AUC analysis (Fig. 2b), the animals in the groups receiving 35 and 40 mg/kg STZ showed larger AUC, indicating higher insulin resistance compared to the control group. Castro et al.⁴⁴ also observed an increased insulin resistance in diabetic Wistar rats consuming a high-fat diet at the dose of 35 mg/kg STZ.

The animals that received the dose of 30 mg/kg STZ did not show insulin resistance (Fig. 2b), indicating that the dose of STZ used did not cause sufficient damage to the pancreatic beta cells, to the point of causing insulin resistance in the animals in this group, as observed in groups 35STZ and 40STZ.

According to Srinivasan et al.³⁹ and Wilson and Islam⁴², an experimental model that combines high-fat diet and low doses of STZ is effective in causing insulin resistance, as well as being efficient in simulating the effects of DM2. Our findings evidence that, the higher the concentration of STZ, the higher the insulin resistance. Thus, 35 and 40 mg/kg STZ associated with a cafeteria-type diet were more efficient in causing insulin resistance. Thirty mg/kg of STZ produced significant hyperglycemia (Table 4), but did not cause significant insulin resistance in the animal model studied (Fig. 2b).

The insulin resistance and DM2 associated or not with metabolic syndrome lead to the release of fatty acids by adipocytes, which accumulate in the liver tissue favoring lipogenesis and increasing liver triglycerides⁴³⁻⁴⁵. It represents an important risk factor for the development of hepatic steatosis. The 35 and 40 mg/kg STZ groups presented greater insulin resistance (Fig. 2), confirming that DM2 is a major contributor to hepatic steatosis⁴³⁻⁴⁵. The results obtained in the present study are also similar to the data by Buettner et al.⁴⁶, who observed hepatic steatosis in animals receiving a high-fat diet containing lard.

The 35 (Fig. 3h) and 40 mg/kg STZ (Fig. 3k) groups showed decrease in pancreatic islets and apoptotic bodies in the islet, corroborating with the data observed in Tables 2 and 5, in which animals treated with 35 and 40 mg/kg STZ presented a lighter pancreas, with decreased area and number of pancreatic islets. These data confirm the diabetogenic action of STZ associated with a cafeteria diet, which leads to irreversible damage to the pancreatic beta cells and to a loss of cellular function to produce and release insulin⁴⁴.

Decompensated diabetes can lead to kidney failure, and approximately 10% of deaths in people with DM2 are attributed to renal failure³. In the present study, the histopathological evaluation of the kidney showed

that animals of the control and 30 mg/kg STZ groups presented standard morphology (Fig. 3f), whereas animals that received the doses of 35 and 40 mg/kg STZ presented renal damage (Fig. 3i-l). Our findings also show (Table 4) that animals in 35 and 40 mg/kg STZ groups had high urea levels, indicating impaired renal function in animals⁴⁷.

Conclusions

Our study proposes an experimental model for the development of DM2 in Wistar rats using a cafeteria diet and low doses of STZ. Our model proved to be an efficient, low-cost model without loss of animals during the experiment. The doses of 35 and 40 mg/kg STZ were effective in simulating metabolic characteristics of DM2 in humans. It was confirmed by the presence of polydipsia, hyperglycemia, altered biochemical tests, insulin resistance and damages to the liver, pancreas, and kidney. Thus, due to economic aspects and the high success rate, we recommend using 35 mg/kg STZ for diabetes induction associated with a cafeteria diet. Our findings are useful for future studies involving DM2 pathogenesis, environmental factor interactions, and evaluation of new treatments.

Author's contribution

Conception and design of the study: Santos MMR, Cavalcante ACFPS, Amaral LA and Souza GHO; Analysis of data: Rafacho BPM, Santos EF and Hiane PA; Histopathological examinations: Portugal LC and Santos BS; Biochemical analyses: Bittencourt Junior FF and Troque T; Manuscript writing: Santos MMR, Rafacho BPM, Santos EF and Hiane PA.

Data availability statement

Data will be available upon request.

Funding

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior

[<https://doi.org/10.13039/501100002322>]

Grant Code 001

Fundação de Apoio ao Desenvolvimento do Ensino, Ciência e Tecnologia do Estado de Mato Grosso do Sul

[<https://doi.org/10.13039/501100005672>]

Grant no. 10/2015

Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Edital no. 26/2021

Acknowledgments

Not applicable.

References

- Guariguata L, Whiting DR, Hambleton L, Beagley J, Linnenkamp U, Shaw JE. Global estimates of diabetes prevalence for 2013 and projections for 2035. *Diabetes Res Clin Pract.* 2014;103(2):137-49. <https://doi.org/10.1016/j.diabres.2013.11.002>
- Chatterjee S, Khunti K, Davies MJ. Type 2 diabetes. *Lancet.* 2017;389(10085):2239-51. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(17\)30058-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(17)30058-2)
- Zheng Y, Ley SH, Hu FB. Global aetiology and epidemiology of type 2 diabetes mellitus and its complications. *Nat Rev Endocrinol.* 2018;14(2):88-98. <https://doi.org/10.1038/nrendo.2017.151>
- Teixeira D, Cecconello AL, Partata WA, Fraga LS, Ribeiro MFM, Guedes RP. The metabolic and neuroinflammatory changes induced by consuming a cafeteria diet are age-dependent. *Nutr Neurosci.* 2019;22(4):284-94. <https://doi.org/10.1080/1028415X.2017.1380892>
- Lalanza JF, Snoeren EMS. The cafeteria diet: a standardized protocol and its effects on behavior. *Neurosci Biobehav Rev.* 2021;122:92-119. <https://doi.org/10.1016/j.neubiorev.2020.11.003>
- Leigh SJ, Kendig MD, Morris MJ. Palatable western-style cafeteria diet as a reliable method for modeling diet-induced obesity in rodents. *J Vis Exp.* 2019;1(153):1-10. <https://doi.org/10.3791/60262>
- Sampey BP, Vanhoose AM, Winfield HM, Freeman AJ, Muehlbauer MJ, Fueger PT, Newgard CB, Malowski L. Cafeteria diet is a robust model of human metabolic syndrome with liver and adipose inflammation: comparison to high-fat diet. *Obesity (Silver Spring).* 2011;19(6):1109-17. <https://doi.org/10.1038/oby.2011.18>
- Islam M, Rupeshkumar M, Reddy KB. Streptozotocin is more convenient than Alloxan for the induction of Type 2 diabetes. *Int J Pharmacol Res.* 2017;7(1):06-11. <https://doi.org/10.7439/ijpr.v7i1.3790>
- Skovso S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. *J Diabetes Investig.* 2014;5(4):349-58. <https://doi.org/10.1111/jdi.12235>
- Veerapur VP, Prabhakar KR, Thippeswamy BS, Bansal P, Srinivasan KK, Unnikrishnan MK. Antidiabetic effect of *Ficus racemosa* Linn. stem bark in highfat diet and low dose streptozotocin-induced type 2 diabetic rats: a mechanistic study. *Food Chem.* 2012;132(1):186-93. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.10.052>
- Castro CA, Silva KA, Buffo MM, Pinto KNZ, Duarte FO, Nonaka KO, Anibal FF, Duarte ACGO. Experimental type 2 diabetes induction reduces serum vaspin, but not

- serum omentin, in Wistar rats. *Int J Clin Exp Pathol*. 2017;98(1):26-33. <https://doi.org/10.1111/iepp.12220>
12. Magalhães DA, Kume WT, Correia FS, Queiroz TS, Allebrandt Neto EW, Santos MP, Kawashita NH, França SA. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *An Acad Bras Cienc*. 2019;91(1):1-14. <http://doi.org/10.1590/0001-3765201920180314>
 13. Pérez-Echarri N, Pérez-Matute P, Marcos-Gómez B, Martínez JA, Moreno-Aliaga J. Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats. *Br J Nutr*. 2009;101(7):1059-67. <https://doi.org/10.1017/S00071145080048307>
 14. Ayoub HM, McDonald MR, Sullivan JA, Tsao R, Platt M, Simpson J, Meckling KA. The effect of anthocyanin-rich purple vegetable diets on metabolic syndrome in obese Zucker rats. *J Med Food*. 2017;20(12):1240-9. <https://doi.org/10.1089/jmf.2017.0025>
 15. Novelli ELB, Diniz YS, Gallhardi CM, Ebaud GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim*. 2007;41(1):111-9. <https://doi.org/10.1258/00236770779399518>
 16. Nascimento OV, Boletti APA, Yuyama LKO, Lima ES. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dubia* HBK. McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. *An Acad Bras Cienc*. 2013;85(1):355-63. <https://doi.org/10.1590/S0001-37652013005000001>
 17. Nascimento TB, Baptista RFF, Pereira PC, Campos DHS, Leopoldo AS, Leopoldo APL, Oliveira Júnior SA, Padovani CR, Cicogna AC, Cordellini S. Alterações vasculares em ratos obesos por dieta rica em gordura: papel da via l-arginina/NO endotelial. *Arq Bras Cardiol*. 2011;97(1):40-5. <https://doi.org/10.1590/S0066-782X2011005000063>
 18. Gomes RM, Bueno FG, Schamber CR, Mello JCP, Oliveira JC, Francisco FA, Moreira VM, Junior MDF, Pedrino GR, Freitas Mathias PC, Miranda RA, Moraes SMF, Natali MRM. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. *J Nutr Biochem*. 2018;61:24-32. <https://doi.org/10.1016/j.jnutbio.2018.07.006>
 19. Zhang M, Lv XY, Li J, Xu ZG, Chen L. The characterization of high-fat diet and multiple low-dose streptozotocin induced type 2 diabetes rat model. *Exp Diabetes Res*. 2008;2008(1):1-9. <https://doi.org/10.1155/2008/704045>
 20. Olokoba AB, Obateru OA, Olokoba LB. Type 2 diabetes mellitus: a review of current trends. *Oman Med J*. 2012;27(4):269-73. <https://doi.org/10.5001/omj.2012.68>
 21. Ferreira LT, Savioli IH, Valenti VE, Abreu LC. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arq Bras Ciênc Saúde*. 2011;36(3):182-88. <https://doi.org/10.7322/abcs.v36i3.59>
 22. Campos LF, Tagliari E, Casagrande TAC, Noronha L, Campos ACL, Matias JEF. Suplementação perioperatória com probióticos na cicatrização de feridas cutâneas em ratos diabéticos. *Arq Bras Cir Dig*. 2020;33(1):e1498. <https://doi.org/10.1590/0102-672020190001e1498>
 23. Hariri N, Gougeon R, Thibault L. A highly saturated fat-rich diet is more obesogenic than diets with lower saturated fat content. *Nutr Res*. 2010;30(9):632-43. <https://doi.org/10.1016/j.nutres.2010.09.003>
 24. Rosado EL, Monteiro JBR. Obesidade e a substituição de macronutrientes da dieta. *Rev Nutr*. 2011;14(2):145-52. <https://doi.org/10.1590/S1415-52732001000200008>
 25. Pushparaj P, Tan CH, Tan BK. Effects of Averrhoa bilimbi leaf extract on blood glucose and lipids in streptozotocin-diabetic rats. *J Ethnopharmacol*. 2000;72(1-2):69-76. [https://doi.org/10.1016/S0378-8741\(00\)00200-2](https://doi.org/10.1016/S0378-8741(00)00200-2)
 26. Al-Amin ZM, Thomson M, Al-Qattan KK, Peltonen-Shalaby R, Ali M. Anti-diabetic and hypolipidaemic properties of ginger (*Zingiber officinale*) in streptozotocin-induced diabetic rats. *Br J Nutr*. 2006;96(4):660-6. <https://doi.org/10.1079/BJN20061849>
 27. Ramachandran S, Naveen KR, Rajinikanth B, Akbar M, Rajasekaran A. Antidiabetic, antihyperlipidemic and in vivo antioxidant potential of aqueous extract of *Anogeissus latifolia* bark in type 2 diabetic rats. *Asian Pac J Trop Dis*. 2012;2(2):S596-S602. [https://doi.org/10.1016/S2222-1808\(12\)60229-1](https://doi.org/10.1016/S2222-1808(12)60229-1)
 28. Reed MJ, Meszaros K, Entes LJ, Claypool MD, Pinkett JG, Gadbois TM, Reaven GM. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. *Metabolism*. 2000;49(11):1390-4. <https://doi.org/10.1053/meta.2000.17721>
 29. Srinivasan K, Viswanad B, Asrat L, Kaul CL, Ramarao P. Combination of high-fat diet-fed and low-dose streptozotocin-treated rat: a model for type 2 diabetes and pharmacological screening. *Pharmacol Res*. 2005;52(4):313-20. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2005.05.004>
 30. Takeshita F, Kodama M, Yamamoto H, Ikarashi Y, Ueda S, Teratani T, Yamamoto Y, Tamatani T, Kanegasaki S, Ochiya T, Quinn G. Streptozotocin-induced partial beta cell depletion in nude mice without hyperglycaemia induces pancreatic morphogenesis in transplanted embryonic stem cells. *Diabetologia*. 2006;49(12):2948-58. <https://doi.org/10.1007/s00125-006-0432-z>
 31. Leopoldo AS, Lima-Leopoldo AP, Nascimento AF, Luvizotto RA, Sugizaki MM, Campos DH, Silva DC, Padovani CR, Cicogna AC. Classification of different degrees of adiposity in sedentary rats. *Braz J Med Biol Res Biol*. 2016;49(4):1-9. <https://doi.org/10.1590/1414-431X20155028>
 32. Magalhães DA, Kume WT, Correia FS, Queiroz TS, Allebrandt Neto EW, Santos MP, Kawashita NH, França SA. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *An Acad Bras Cienc*. 2019;91(1):e20180314. <https://doi.org/10.1590/0001-3765201920180314>

33. Jiao Y, Wang X, Jiang X, Kong F, Wang S, Yan C. Antidiabetic effects of *Morus alba* fruit polysaccharides on high-fat diet- and streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats. *J Ethnopharmacol.* 2017;199:119-27. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.02.003>
34. Bitzur R, Cohen H, Kamari Y, Shaish A, Harats D. Triglycerides and HDL cholesterol: stars or second leads in diabetes?. *Diabetes Care.* 2009;32(2):373-7. <https://doi.org/10.2337/dc09-5343>
35. Adiels M, Borén J, Caslake MJ, Stewart P, Soro A, Westerbacka J, Wennberg B, Olofsson SO, Packard C, Taskiran MR. Overproduction of VLDL1 driven by hyperglycemia is a dominant feature of diabetic dyslipidemia. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2005;25(8):1697-703. <https://doi.org/10.1161/01.ATV.0000172689.53992.25>
36. Castaneda C. Type 2 Diabetes Mellitus and exercise. *Nutr Clin Care.* 2000;3(6):349-58. <https://doi.org/10.1046/j.1523-5408.2000.00086.x>
37. Pandya D, Nagrajappa AK, Ravi KS. Assessment and correlation of urea and creatinine levels in saliva and serum of patients with chronic kidney disease, diabetes and hypertension - A research study. *J Clin Diagn Res.* 2016;10(10):2C58-2C62. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2016/20294.8651>
38. Ulla A, Alam MA, Sikder B, Sumi FA, Rahman MM, Habib ZF, Mohammed MK, Subhan N, Hossain H, Reza HM. Supplementation of *Syzygium cumini* seed powder prevented obesity, glucose intolerance, hyperlipidemia and oxidative stress in high carbohydrate high fat diet induced obese rats. *BMC Complement Altern Med.* 2017;17(1):289. <https://doi.org/10.1186/s12906-017-1799-8>
39. Garcia-Compean D, Jaquez-Quintana JO, Gonzalez-Gonzalez JA, Maldonado-Garza H. Liver cirrhosis and diabetes: risk factors, pathophysiology, clinical implications and management. *World J Gastroenterol.* 2009;15(3):280-8. <https://doi.org/10.3748/wjg.15.280>
40. Byrne MF, Mitchell RM, Stiffler H, Jowell PS, Branch MS, Pappas TN, Tyler D, Baillie J. Extensive investigation of patients with mild elevations of serum amylase and/or lipase is 'low yield'. *Can J Gastroenterol.* 2002;16(12):849-54. <https://doi.org/10.1155/2002/836012>
41. Abdul-Ghani MA, Balas B, Matsuda M, DeFronzo RA. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes Care.* 2007;30(1):89-94. <https://doi.org/10.2337/dc06-1519>
42. Wilson RD, Islam MS. Fructose-fed streptozotocin injected rat: an alternative model for type 2 diabetes. *Pharmacol Rep.* 2012;64(1):129-39. [https://doi.org/10.1016/S1734-1140\(12\)70739-9](https://doi.org/10.1016/S1734-1140(12)70739-9)
43. Loria P, Leonardo A, Anania F. Liver and diabetes. A vicious circle. *Hepatol Res.* 2013;43(1):51-64. <https://doi.org/10.1111/j.1872-034X.2012.01031.x>
44. Dai W, Ye L, Liu A, Wen SW, Deng J, Wu X, Lai Z. Prevalence of nonalcoholic fatty liver disease in patients with type 2 diabetes mellitus. *Medicine (Baltimore).* 2017;96(39):e8179. <http://doi.org/10.1097/MD.00000000000008179>
45. Forlani G, Giorda C, Manti R, Mazzella N, Cosmo S, Rossi MC, Nicolucci A, Bartolo P, Ceriello A, Guida P, AMD-Annals Study Group. The burden of NAFLD and its characteristics in a nationwide population with type 2 diabetes. *J Diabetes Res.* 2016;2016:2931985. <http://doi.org/10.1155/2016/2931985>
46. Buettner R, Parhofer KG, Woenckhaus M, Wrede CE, Kunz-Schughart LA, Schölmerich J, Bollheimer LC. Defining high-fat-diet rat models: metabolic and molecular effects of different fat types. *J Mol Endocrinol.* 2006;36(3):485-501. <https://doi.org/10.1677/jme.1.01909>
47. Stuglin C, Prasad K. Effect of flaxseed consumption on blood pressure, serum lipids, hemopoietic system and liver and kidney enzymes in healthy humans. *J Cardiovasc Pharmacol Ther.* 2005;10(1):23-27. <https://doi.org/10.1177/107424840501000103>

5.4 Efeitos metabólicos da FT

Os materiais e métodos desse experimento estão apresentados na forma de artigo, intitulado: “Efeitos metabólicos da farinha de tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) em ratos diabéticos”, a ser submetido no periódico Acta Cirúrgica Brasileira, qualis/CAPES B1, fator de impacto: 1,388. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética (Protocolo nº 895/2017) (Anexo II) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS).

Efeitos metabólicos da farinha de tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) em ratos diabéticos

Mirelly Marques Romeiro Santos^{1*}, Andressa Carolina Farias Pereira Subtil Cavalcante², Luane Aparecida do Amaral¹, Gabriel Henrique Oliveira de Souza³, Bárbara Suzuki dos Santos⁴, Luciane Candeloro Portugal⁵, Felipe Francisco Bittencourt Junior⁶, Thiago Troquez⁶, Elisvânia Freitas dos Santos⁷, Priscila Aiko Hiane⁸

1. Mestrado. Programa em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brasil.
2. Nutricionista. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentação e Nutrição - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brasil.
3. Tecnólogo em Alimentos. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentação e Nutrição - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brasil.
4. Farmacêutico. Instituto de Biologia - Laboratório de Histologia - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brasil.
5. Doutorado. Instituto de Biologia - Laboratório de Histologia - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brasil.
6. Doutorado. Laboratório de Análises Clínicas - Universidade Federal da Grande Dourados (UFGD) – Dourados (MS), Brasil.
7. Doutorado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Alimentação e Nutrição - Universidade Federal do Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brasil.
8. Doutorado. Programa em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS) - Campo Grande (MS), Brasil.

Resumo

Objetivo: O presente estudo avaliou os efeitos metabólicos da farinha da casca e polpa do tucumã (FT), por meio da suplementação na alimentação de animais diabéticos. **Métodos:** Os ratos foram alocados em 2 grupos controles: sendo um grupo que recebeu ração comercial (C, n = 10), um grupo controle diabético + dieta de cafeteria (D, n = 9) e três grupos diabético + dieta de cafeteria + FT em 3 doses diferentes: 2% de FT (D2FT, n=8); 4% de FT (D4FT, n=8); 8% de FT (D8FT, n=8). A indução do diabetes foi realizada através de injeção única de STZ na dose de 35 mg/kg. Os grupos foram avaliados por meio de análises antropométricas, bioquímicas, teste de resistência à insulina e parâmetros histológicos. **Resultados:** Os animais que receberam a maior dose de suplementação de FT apresentaram maiores valores de consumo hídrico, glicemia e triglicerídeos, bem como menores valores de insulina e peptídeo C, quando comparados ao grupo controle. Ainda, todos os animais diabéticos que receberam ou não a suplementação de FT apresentaram resistência à insulina. **Conclusão:** A suplementação de farinha de tucumã não foi eficiente em reverter ou minimizar os efeitos metabólicos ocasionados pelo Diabetes tipo 2.

Introdução

Segundo a Sociedade Brasileira de Diabetes (SBD) (2019)¹ no ano de 2017 o Brasil ocupava a 4ª posição (12,5 milhões de pessoas diabéticas) no ranking mundial dentre os países com maior número de pessoas com diabetes mellitus (DM). Estimativas apontam que no ano de 2045, este número deve alcançar 628,6 milhões de pessoas com esta síndrome no mundo todo, e a projeção para o Brasil são de 20,3 milhões de pessoas diabéticas². De acordo com a American Diabetes Association (2019)³, o diabetes mellitus tipo 2 corresponde a 90 a 95% de todos os casos de diabetes.

No Cerrado predominam várias espécies de frutas que são consideradas fontes de proteínas, fibras, ácidos graxos, calorias, vitaminas e minerais como o cálcio e o fósforo, possuem grande potencial antioxidante e ainda apresentam efeitos benéficos no manejo do diabetes mellitus⁴⁻⁹.

O tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) é um fruto típico do Cerrado, também conhecido como tucumã-de-Goiás e tucumã-do-brejo, é encontrado principalmente nos Estados de Goiás, Tocantins e Mato Grosso, ocorrendo geralmente em várzeas úmidas e brejosas próximas a cursos d'água. Os seus frutos são elipsóides com 3,5 a 4,5 cm de comprimento e 2 a 3 cm de diâmetro, são lisos de cor alaranjada ou alaranjada-amarelada quando maduros, com mesocarpo fibro-carnoso e adocicado¹⁰.

Em um estudo que avaliou a composição da polpa seca (mesocarpo+exocarpo) dos frutos do tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.), os autores obtiveram os seguintes valores para umidade: 10,22%, cinzas: 3,58%, proteínas: 5,18%, lipídios: 18,28%, carboidratos: 31,46%, fibra total: 35,95%, calorias: 311,08 kcal/100g¹¹. Alguns estudos avaliaram a composição de ácidos graxos presentes no óleo da polpa do tucumã, os autores relataram um alto teor de ácidos graxos monoinsaturados, predominando o ácido oleico em sua composição, com os seguintes valores: 67,62%¹², 65,10%¹³, 75,34%¹⁴ e 45,28%¹¹.

Considerando a composição nutricional dos frutos do tucumã, ressalta-se o teor de fibras alimentares e de ácidos graxos monoinsaturados, especialmente o ácido oleico. Estes compostos têm mostrado efeitos benéficos relacionados ao DM2. Em um estudo de revisão, Mc Rae (2018)¹⁵, observou que o aumento da ingestão de fibras alimentares demonstrou efeitos benéficos na prevenção do desenvolvimento de DM2, e que o consumo de fibras solúveis auxilia na redução da glicemia em jejum de pacientes com DM2. Em outro estudo de revisão, Weickert e Pfeiffer (2018)¹⁶ observaram que as fibras solúveis apresentaram efeitos benéficos na melhora da resposta glicêmica pós prandial, e o consumo de fibras insolúveis reduz o risco de desenvolvimento de DM2, bem como ajudam na diminuição da resistência à insulina. Palomer *et al.* (2018)¹⁷ e Rehman *et al.* (2020)¹⁸, relatam que o ácido oleico apresenta efeitos protetores com relação ao desenvolvimento do DM2, e ainda aumenta a sensibilidade a insulina.

Tendo em vista, o presente estudo avaliou os efeitos metabólicos da farinha da casca e polpa do tucumã (FT), por meio da suplementação na alimentação de animais diabéticos.

Materiais e Métodos

Material Botânico

Os frutos de tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) foram coletados na Fazenda São Sebastião, no Município de Limeira do Oeste, Minas Gerais, nas coordenadas geográficas: 19°18'42" S, 50°43'25 " W. A planta foi identificada, e a exsicata depositada no herbário da UFMS sob o número CGMS 54609 e SISGEN A23EE4B.

O despulpamento dos frutos consistiu na separação da polpa com casca (mesocarpo e epicarpo), que foi submetida à desidratação a 45°C em estufa de circulação forçada de ar por um período de 48 horas. O material desidratado foi triturado grosseiramente em cutter (SIRE®, Brasil) e posteriormente em turrax (TECNAL®, Brasil). A amostra triturada foi peneirada em peneira de 60 mesh para obter uniformidade de tamanho de partícula.

Animais experimentais

O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética (Protocolo nº 895/2017) da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). Quarenta e três ratos Wistar machos (aproximadamente 200 g) foram obtidos do Biotério Central da UFMS.

Os animais foram alojados em caixas de polipropileno (dois animais por caixa) em condições ambientais controladas: temperatura de $22 \pm 2^\circ\text{C}$, umidade relativa de 50-60%, ciclo claro/escuro de 12 horas e controle da ingestão hídrica. A dieta foi monitorada duas vezes por semana durante o experimento.

Após a indução do diabetes, o controle hídrico foi realizado quatro vezes por semana devido à polidipsia. Para os cálculos foi considerada a diferença entre a quantidade ofertada e a quantidade restante de alimento e água.

Indução do diabetes experimental

Os animais foram randomizados inicialmente em dois grupos: 1) Grupo Não diabético (C) animais recebendo dieta padrão (n=10); 2) Grupo Diabético (D) animais recebendo dieta de cafeteria (n=33), por um período de 4 semanas. Após esse período foi realizada a indução do diabetes (apenas nos animais do grupo diabético) através de injeção única de STZ (Sigma-Aldrich, San Luis, MO, Estados Unidos) na dose de 35 mg/kg, que foi previamente definida em estudos do nosso grupo¹⁹. A STZ foi diluída em tampão citrato de sódio (0,01M e pH 4,5), e injetada por via intraperitoneal. O grupo controle (não diabético) recebeu apenas tampão citrato de sódio. Todos os animais permaneceram em jejum por um período de 8 horas, antes de receber a injeção de STZ ou tampão citrato de sódio. Os animais receberam alimentação após 6 horas do período de indução. Após 48 horas, os animais foram novamente deixados de jejum (8 horas) e a glicemia foi medida com glicosímetro portátil (Injex Sens II). Os animais que apresentaram glicemia de jejum superior a 250mg/dL foram considerados diabéticos^{20,21}.

Grupos experimentais e dieta

Os ratos foram alocados em 2 grupos controles: sendo um grupo que recebeu ração comercial (C, n = 10), um grupo controle diabético que recebeu dieta de cafeteria (D, n = 9) e três grupos diabéticos que receberam a suplementação da FT em 3 doses diferentes: animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 2% de FT (D2FT, n=8); animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 4% de FT (D4FT, n=8); e animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 8% de FT (D8FT, n=8), conforme ilustrado na Figura 1.

Os animais dos grupos diabéticos foram alimentados com dieta de cafeteria contendo 35% de ração comercial, 10% de banha, 10% de amendoim, 10% de chocolate em pó, 10% de biscoito wafer de chocolate e 25% de açúcar refinado, baseado em Pérez-Echarri *et al.* (2009)²².

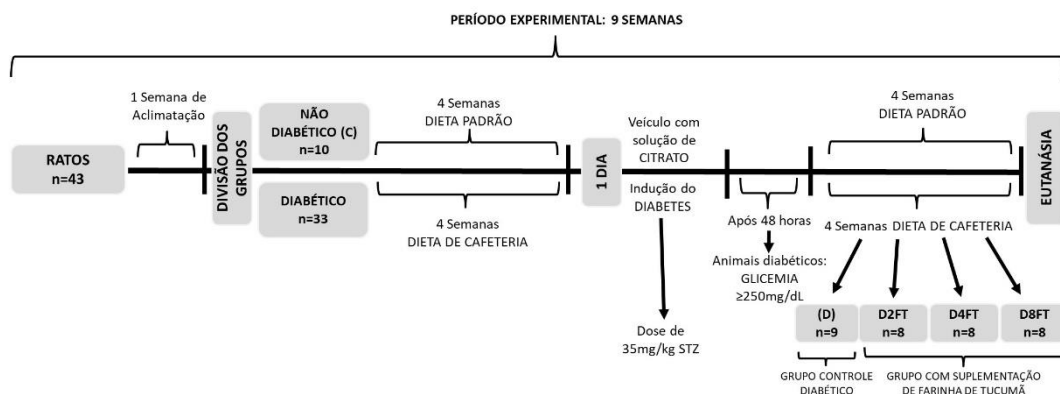


Figura 1. Delineamento experimental.

Avaliação antropométrica

O ganho de peso, comprimento, circunferências torácica e abdominal foram avaliados de acordo com Novelli *et al.* (2007)²³.

Eutanásia e coleta de amostras

Ao final das nove semanas, os animais foram colocados em jejum de 8 horas, posteriormente, foram anestesiados (inalação) com isoflurano e, em seguida, foi realizada a

coleta de sangue na cavidade retro-orbital. A morte foi confirmada por overdose de anestesia. O sangue foi centrifugado a 3.500 rpm/15 min para obtenção do soro. Após a eutanásia, as gorduras retroperitoneal, epididimal e perirrenal de cada animal foram completamente retiradas e pesadas em balança analítica para posterior comparação entre os grupos²⁴. O índice de adiposidade (IA) foi calculado pela razão (gordura corporal/peso corporal final) $\times 100$ ²⁵. Fígado, rim e pâncreas também foram coletados para avaliação histológica.

Avaliação bioquímica

Os seguintes parâmetros foram determinados no soro: colesterol total, lipoproteína de alta densidade (HDL), glicose, marcadores de função hepática (alanina aminotransferase – ALT, aspartato aminotransferase – AST, alanina aminotransferase), parâmetros renais (ureia, creatinina e ácido úrico), perfil proteico (albumina e proteína total) e α -amilase utilizando Cobas C111 de kits comerciais (Roche, Estados Unidos) e espectrofotometria.

Teste de tolerância à insulina

O teste de tolerância à insulina foi determinado quatro dias antes do final do experimento. O teste foi realizado em estado alimentado. A glicemia foi verificada no tempo 0 (antes da administração intraperitoneal de insulina) por meio de glicosímetro (Injex Sens II), através de uma pequena incisão na veia caudal. Em seguida, a insulina (NovoRapid Penfill) foi administrada por via intraperitoneal (1,5 UI de insulina/kg de peso corporal), e a glicemia foi aferida aos 5, 10 e 15 minutos, utilizando o procedimento adaptado de Ayoub *et al.* (2017)²⁶.

Análise histológica

Fígado e pâncreas foram colocados em solução de formalina tamponada a 10% (para fixação) e mantidos em álcool 70% até a inclusão em parafina. Após isso, foram obtidos cortes de 5 μ m de espessura. As lâminas foram desparafinadas e coradas com hematoxilina e eosina.

Microscopia (Leica Application Suite, versão 4.0) foi usada para análise. As imagens foram capturadas com ampliação 40x.

As análises histológicas foram baseadas nos parâmetros de:

- Pâncreas: área e número de ilhotas, vacuolização celular das ilhotas pancreáticas e porção exócrina;
- Fígado: esteatose hepática e vasocongestão.

A análise da área das ilhotas pancreáticas foi realizada usando 20 imagens digitais (cor TIFF de 8 bits, 3.264×2.448 pixels, ampliação $\times 200$) para cada pâncreas ($n = 6/\text{grupo}$). Foi utilizada a câmera fotográfica Nikon D3100 acoplada ao microscópio Zeiss Primo Star. O programa utilizado para medir as áreas das ilhotas foi o Image Processing and Analysis in Java (ImageJ). A análise quantitativa do número de ilhotas pancreáticas foi realizada usando microscópio Leica DM500 com ampliação de 50x. Foram utilizados campos pancreáticos ($n = 6$ animais/grupo). A metodologia foi baseada no artigo de Gomes *et al.* (2017)²⁷.

Análise estatística

Os resultados foram expressos como média $\pm$ EPM (erro padrão da média). Os dados foram analisados pelo software GraphPad Prism versão 6.0 usando análise de variância (one-way ANOVA) pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0,05$ foram definidos como nível de significância.

Resultados

A média dos resultados referentes aos parâmetros antropométricos, ingestão hídrica e alimentar dos animais dos grupos experimentais estão apresentados na tabela 1.

Tabela 1. Parâmetros antropométricos, ingestão hídrica e alimentar dos grupos experimentais.

Controle M $\pm$ EPM	Diabético M $\pm$ EPM	D2FT M $\pm$ EPM	D4FT M $\pm$ EPM	D8FT M $\pm$ EPM
-------------------------	--------------------------	---------------------	---------------------	---------------------

Peso inicial (g)	358,30±11,20	322,40±16,59	313,20±12,41	311,40±11,61	310,50±11,30
Peso final (g)	385,60±10,58 ^a	345,30±16,67 ^{ab}	343,90±10,71 ^{ab}	325,50±12,71 ^b	334,50±13,67 ^{ab}
Ganho de peso (g)	27,30±4,94	22,94±4,09	30,69±4,22	14,06±6,38	24,00±6,11
CT (cm)	16,36±0,27	16,37±0,24	16,34±0,23	16,07±0,13	16,13±0,25
CA (cm)	18,35±0,36	18,33±0,34	18,24±0,27	18,23±0,24	18,00±0,25
Ingestão de ração (g/dia)	24,85±0,70 ^{ab}	23,68±1,06 ^b	28,22±0,86 ^{ab}	27,86±1,91 ^{ab}	28,44±0,83 ^a
Ingestão de água (mL/dia)	39,34±1,81 ^b	83,41±14,69 ^{ab}	101,20±13,84 ^{ab}	120,50±18,80 ^a	114,10±4,43 ^a

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); M: média; EPM: erro padrão da média; CA: circunferência abdominal; CT: circunferência torácica.

Peso dos órgãos e tecido adiposo

Os resultados obtidos para o peso dos órgãos e tecido adiposo não demonstraram diferença estatística ($p > 0,05$), conforme observado na tabela 2.

Tabela 2. Peso dos órgãos e tecido adiposo dos grupos experimentais.

	Controle M±EPM	Diabético M±EPM	D2FT M±EPM	D4FT M±EPM	D8FT M±EPM
Fígado (g)	12,18±0,63	13,60±0,73	14,60±0,75	13,15±0,82	13,09±0,49
Rim (g)	1,24±0,05	1,33±0,08	1,45±0,07	1,41±0,12	1,43±0,09
Pâncreas (g)	1,39±0,11	1,33±0,07	1,26±0,09	1,14±0,07	1,28±0,05
Tecido Adiposo					
Epididimal (g)	5,32±0,32	4,73±0,62	4,91±0,62	3,60±0,29	4,47±0,41
Perirrenal (g)	0,99±0,26	0,91±0,18	0,99±0,20	0,58±0,04	0,82±0,10
Retroperitoneal (g)	3,06±0,31	1,78±0,30	3,18±0,71	1,52±0,30	1,97±0,24
IA (%)	2,43±0,14	2,42±0,36	2,58±0,36	1,74±0,09	2,30±0,19

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p < 0,05$); M: média; EPM: erro padrão da média; IA: índice de adiposidade.

Parâmetros bioquímicos

A tabela 3 estão representados os resultados das médias dos parâmetros bioquímicos analisados nos animais dos grupos experimentais.

Tabela 3. Parâmetros bioquímicos dos grupos experimentais.

	Controle M±EPM	Diabético M±EPM	D2FT M±EPM	D4FT M±EPM	D8FT M±EPM
Glicose (mg/dL)	172,90±12,20 ^b	343,60±54,41 ^{ab}	385,10±40,81 ^{ab}	362,20±47,35 ^{ab}	418,50±80,77 ^a
Colesterol (mg/dL)	61,50±3,00	62,59±2,76	61,11±10,64	64,63±8,73	52,11±8,00
HDL (mg/dL)	60,60±2,50	62,60±2,81	61,04±10,42	63,61±5,68	51,61±6,73

Triglicerídeos (mg/dL)	34,08±2,62 ^b	82,29±13,85 ^{ab}	86,01±17,09 ^{ab}	70,87±13,15 ^{ab}	102,60±27,25 ^a
Proteína total (g/L)	60,54±1,22	60,34±1,60	54,80±6,30	55,40±3,38	49,81±4,83
Creatinina (mg/dL)	0,44±0,02	0,42±0,04	0,40±0,03	0,46±0,05	0,35±0,05
Albumina (g/L)	42,58±0,65	42,96±1,30	36,87±4,38	41,44±1,29	35,34±3,39
Ácido úrico (mg/dL)	1,28±0,19	1,61±0,31	2,94±0,51	2,05±0,59	2,19±0,68
Ureia (mg/dL)	32,57±1,61	32,80±3,51	39,63±7,06	41,69±5,37	48,38±7,90
AST (U/L)	78,26±2,11	89,28±5,71	94,83±9,67	74,85±6,14	89,09±7,06
ALT (U/L)	27,46±2,11	46,51±7,13	39,90±4,96	37,04±3,61	45,63±9,34
α-Amilase (U/L)	1859,00±106,10	1934,00±125,50	1735,00±252,20	1746,00±139,70	1609,00±162,80
Insulina	4,17±0,92 ^a	0,71±0,09 ^b	2,34±0,73 ^{ab}	1,81±0,40 ^{ab}	0,69±0,18 ^b
Peptídeo C	208,80±40,57 ^a	14,86±4,97 ^b	99,85±45,79 ^{ab}	130,90±77,42 ^{ab}	34,69±1,54 ^b

Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$); M: média; EPM: erro padrão da média; CA: circunferência abdominal; CT: circunferência torácica.

Teste de tolerância à insulina

Na figura 2 estão representados os dados referentes ao teste de resistência à insulina.

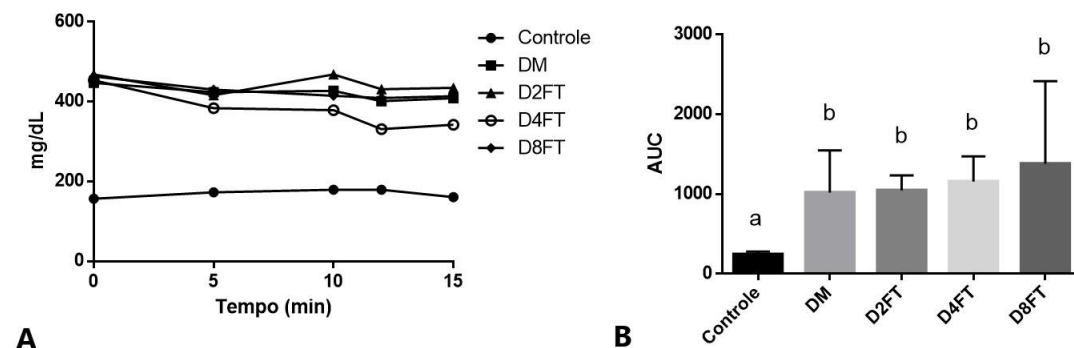


Figura 2. A: Teste de tolerância à insulina aplicado nos tempos 0, 5, 10 e 15 minutos; B: Área sob a curva (AUC) do teste de resistência à insulina. Letras diferentes indicam diferença significativa pelo teste de Tukey ($p<0,05$).

Análise histológica

Através das análises histológicas do fígado (Figura 3) foi observado que todos os grupos apresentaram morfologia padrão, sem nenhuma alteração microscópica.

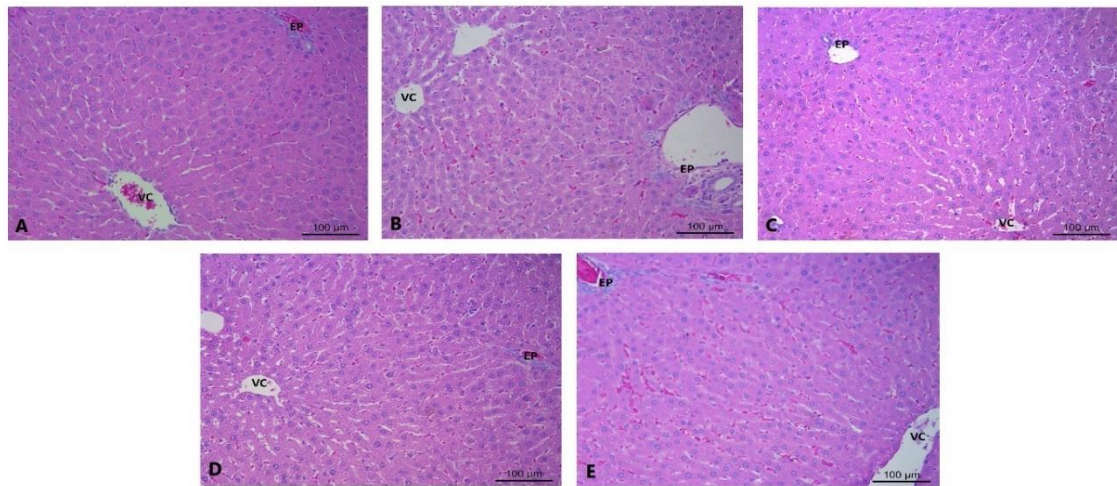


Figura 3. A: Grupo Controle (C); B: Grupo Diabético (DM); C: Grupo com animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 2% de FT (D2FT); D: Grupo com animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 4% de FT (D4FT); E: Grupo com animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 8% de FT (D8FT); EP: Espaço Porta; VC: Veia Centrolobular.

No entanto, o pâncreas (Figura 4) em todos os grupos diabéticos, tratados ou não, apresentaram degeneração vacuolar nas ilhotas pancreáticas, mostrando redução aparente na quantidade e tamanho das ilhotas.

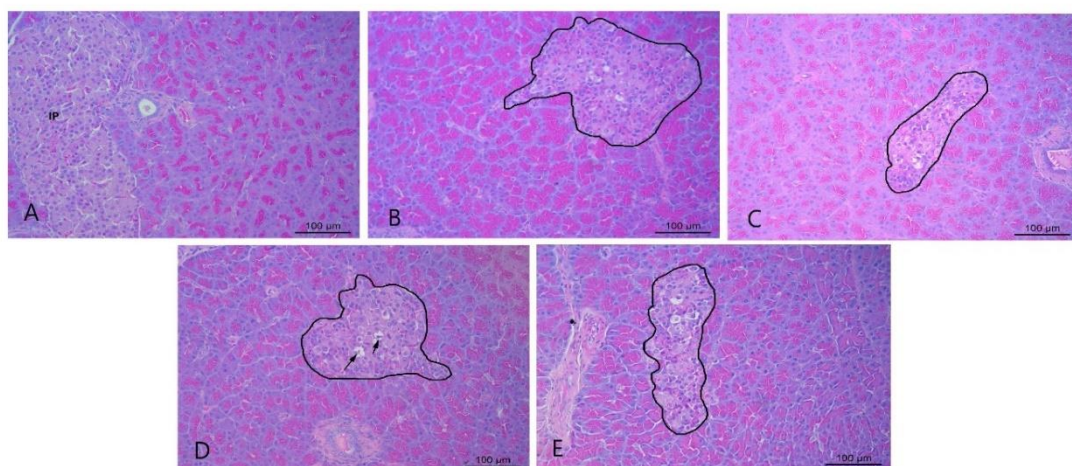


Figura 4. A: Grupo Controle (C); B: Grupo Diabético (DM); C: Grupo com animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 2% de FT (D2FT); D: Grupo com animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 4% de FT (D4FT); E: Grupo com animais diabéticos tratados com dieta de cafeteria contendo 8% de FT (D8FT); IP: Ilhota Pancreática; Demarcação em preto (linha): marcando área da ilhota em processo de degeneração, com

áreas irregulares e com menos células Beta; Seta fina preta: degeneração vacuolar das células beta na ilhota pancreática.

Discussão

Ao analisar os resultados apresentados na tabela 1, verifica-se que os animais do grupo D4FT apresentaram menor peso final quando comparados com os animais do grupo controle. A STZ leva a destruição das células β pancreáticas, comprometendo a secreção da insulina, essa condição estimula uma resposta hormonal fazendo com que os tecidos dependentes de insulina metabolizem lipídios ao invés de carboidratos, levando a processos catabólicos (maior proteólise e lipólise), ocasionando perda de peso corporal e aumento da ingestão alimentar, quadro característico do DM2^{28,29}. Guo *et al.* (2018)³⁰ e Santos *et al.* (2021)¹⁹, também observaram que os animais diabéticos de seus respectivos estudos, apresentaram um menor peso ao comparar com os animais não diabéticos.

Com relação ao consumo hídrico, os animais dos grupos D4FT e D8FT apresentaram um maior consumo quando comparado com o grupo controle. Nunes *et al.* (2018)⁹ avaliaram os efeitos da suplementação de diferentes doses do óleo da amêndoa de *Acrocomia aculeata* em ratos com DM2. Neste estudo todos os animais diabéticos (sem suplementação e que receberam o suplemento) apresentaram maiores valores para o consumo hídrico e menor peso quando comparados com os animais do grupo não diabético. Ressalta-se que perda de peso e polidipsia são sintomas presentes no DM2³.

Em certos casos é possível notar alteração no peso dos órgãos de animais tratados com diferentes tipos de dieta, como é o caso de animais tratados com dietas hiperlipídicas, os quais acabam apresentando uma maior deposição de gordura corporal e hepática, levando a um maior peso desses tecidos quando comparados com animais que consomem apenas dieta comercial, embora, no presente estudo não foi observado diferença estatística entre os pesos dos tecidos avaliados, o que é confirmado pela análise histológica do fígado (figura 3)^{31,32}.

Outro fator que pode ocasionar uma alteração do peso de órgãos de animais, é a indução de diabetes por meio da administração de STZ, a qual leva a destruição das células beta pancreáticas com posterior redução da massa celular do pâncreas desses animais o que pode ser observado no presente estudo, uma vez que os grupos diabéticos, tratados ou não, apresentaram degeneração vacuolar nas ilhotas pancreáticas, mostrando redução aparente na quantidade e tamanho das ilhotas, embora não tenham apresentado diferença estatística para o peso do pâncreas¹⁹.

De acordo com a American Diabetes Association (2011)³, o DM2 é caracterizado por distúrbios no metabolismo da glicose e de ácidos graxos. Ao observar a tabela 3, os animais que receberam a suplementação de 8% de FT apresentaram valores de glicemia e triglicerídeos maiores quando comparados com o grupo controle. Embora no presente estudo não tenha sido dosado o teor de frutose (um monossacarídeo presente em frutas) da FT, sabe-se que o alto consumo de frutose ou o seu consumo associado a dietas hipercalóricas demonstram esse efeito em aumentar os triglicerídeos séricos, fato observado no presente estudo, já que associamos a FT a uma dieta de cafeteria. No entanto, o consumo de frutose em dietas normocalóricas não se observa tal efeito³³⁻³⁶.

Já ao analisar os valores de peptídeo C, uma proteína essencial para a síntese de insulina e que desempenha um papel importante no controle da glicemia³⁷⁻³⁹, nota-se que o animais do grupo D8FT apresentaram valores diminuídos dessa proteína, e ainda, menores níveis de insulina, assim como o grupo diabético ($p < 0,05$ quando comparado com grupo controle). Sabe-se que a destruição das células beta pancreáticas, as quais são responsáveis pela produção de insulina é um dano causado pela ação da STZ³⁹. Demonstrando que a suplementação de 8% de FT não foi eficiente em controlar os danos decorrentes do DM2.

Após a administração de insulina, os níveis de glicose devem diminuir de forma rápida, revelando uma maior sensibilidade a insulina⁴⁰. No presente estudo os níveis de glicose dos

animais diabéticos não tratados e tratados com FT, se apresentaram maiores quando comparados com o grupo controle (Figura 2A). Ao analisar a AUC (figura 2B) os grupos DM, D2FT, D4FT e D8FT apresentaram uma maior AUC, indicando uma maior resistência à insulina em relação ao grupo controle. Estudos com animais diabéticos sem tratamento também demonstraram uma maior resistência à insulina ao comparar com o grupo não diabético^{19,20}. Isso demonstra que nenhuma das doses de FT administradas aos animais foi eficiente em minimizar os danos metabólicos decorrentes da indução do DM2 nesses animais.

Conclusão

Com base na avaliação dos resultados de dados antropométricos, bioquímicos, teste de resistência à insulina e parâmetros histológicos, a suplementação de 2, 4 ou 8% de farinha de tucumã não foi eficiente em reverter ou minimizar os efeitos metabólicos ocasionados pelo diabetes tipo 2. Embora a suplementação de farinha de tucumã não tenha sido eficiente no modelo proposto neste estudo, este fruto pode apresentar efeitos positivos em outros modelos, como obesidade ou síndrome metabólica, tendo em vista a sua composição nutricional.

Referências

1. Sociedade Brasileira de Diabetes. Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. São Paulo: Editora Clannad, 2019.
2. International Diabetes Federation. IDF Atlas. 8th ed. Bruxelas, Belgium: International Diabetes Federation; 2017.
3. American Diabetes Association. Standards of Medical Care in Diabetes - 2019 Abridged for Primary Care Providers. Diabetes Care. 2019;37(1):11-34.
4. Caldeira SD, Hiane PA, Ramos MIL, Filho MMR. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* SW.) e do tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do estado de Mato Grosso do Sul. Boletim do CEPPA. 2004;22(1):145-154.
5. Ramos MIL, Ramos Filho MM, Hiane PA, Braga Neto JA, Siqueira EMA. Qualidade nutricional da polpa de bocaiúva *Acromia aculeata* (Jacq.) Lodd.. Ciênc Tecnol Aliment. 2008;28(0):90-94.

6. Moraes ML, Silva ACR, Araújo CRR, Esteves EA, Dessimoni-Pinto NAV. Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do cerrado brasileiro. *Rev Bras Frutic.* 2013;35(2):355-360.
7. Sales ALCC. Efeito da suplementação com aveia, linhaça, gergelim semente de girassol e jatobá sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus em ratos. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Piauí/UFPI, Teresina, 2011.
8. Guimarães ACG. Potencial funcional e nutricional de farinhas de jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e bacaba (*Oenocarpus bacaba*). 2013. 109 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras/UFLA, Lavras, 2013.
9. Nunes AA, Buccini DF, Jaques JAS, Portugal LC, Guimarães RCA, Favaro SP, Caldas RA, Carvalho CME. Effect of *Acrocomia aculeata* Kernel Oil on Adiposity in Type 2 Diabetic Rats. *Plant Foods Hum Nutr.* 2018;73(1):61-67.
10. Lorenzi H, Souza HM, Costa JTM, Cerqueira LSC, Ferreira E. **Palmeiras brasileiras exóticas e cultivadas**. 1 ed. Plantarum, 2004, 432 p.
11. Santos MMR, Fernandes DS, Cândido CJ, Cavalheiro LF, Silva AF, Nascimento VA, Ramos Filho MM, Santos EF, Hiane PA. Physical-chemical, nutritional and antioxidant properties of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) fruits. *Sem Cienc Agrar.* 2018;39(4):1517-1532.
12. Ferreira ES, Lucien VG, Amaral AS, Silveira CS. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). *Alimen Nutr Araraquara.* 2008;19(4):427-433.
13. Rodrigues AMC, Darnet S, Silva LHM. Fatty acids profiles and tocoferol contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucumã (*Astrocaryum vulgare*), Mari (*Poraqueiba paraensis*) and Inaja (*Maximiliana maripa*) fruits. *J Braz Chem Soc.* 2010;21(10):2000-2004.
14. Santos MFG, Alves RE, Brito ES, Silva SM, Silveira MRS. Quality characteristics of fruits and oils of palms native to the Brazilian Amazon. *Rev Bras Frutic.* 2017;39:1-6.
15. Mc rae MP. Dietary Fiber Intake and Type 2 Diabetes Mellitus: An Umbrella Review of Meta-analyses. *J Chiropr Med.* 2018;17(1):44-53.
16. Weickert MO, Pfeiffer AFH. Impact of Dietary Fiber Consumption on Insulin Resistance and the Prevention of Type 2 Diabetes. *J Nutr.* 2018;148(1):7-12.
17. Palomer X, Pizarro-Delgado J, Barroso E, Vázquez-Carrera M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. *Trends Endocrinol Metab.* 2018;29(3):178-190.
18. Rehman K, Haider K, Jabeen K, Akash MSH. Current perspectives of oleic acid: Regulation of molecular pathways in mitochondrial and endothelial functioning against insulin resistance and diabetes. *Rev Endocr Metab Disord.* 2020;21(4):631-643.

19. Santos MMR, Cavalcante ACFPS, Amaral LA, Souza GHO, Santos BS, Portugal LC, Bittencourt Junior FF, Troquez T, Rafacho BPM, Hiane PA, Santos EF. Combination of cafeteria diet with intraperitoneally streptozotocin in rats. A type-2 diabetes model. *Acta Cir Bras.* 2021;36(7):1-10.
20. Castro CA, Silva KA, Buffo MM, Pinto KNZ, Duarte FO, Nonaka KO, Aníbal FF, Garcia AC, Duarte GO. Experimental type 2 diabetes induction reduces sérum vaspin, but not serum omentin, in Wistar rats. *Int J Exp Pathol.* 2017;98(1):26-33.
21. Khare P, Datusalia AK, Sharma SS. Parthenolide, an nf-jb inhibitor ameliorates diabetes-induced behavioural deficit, neurotransmitter imbalance and neuroinflammation in type 2 diabetes rat model. *Neuromolecular Med.* 2017;19(1):101-112.
22. Pérez-Echarri N, Pérez-Matute P, Marcos-Gomez B, Martínez JA, Moreno-Aliaga J. Effects of eicosapentaenoic acid ethyl ester on visfatin and apelin in lean and overweight (cafeteria diet-fed) rats. *Br J Nutr.* 2009;101(7):1059-67.
23. Novelli ELB, Diniz YS, Galhardi CM, Ebaid GM, Rodrigues HG, Mani F, Fernandes AA, Cicogna AC, Novelli Filho JL. Anthropometrical parameters and markers of obesity in rats. *Lab Anim.* 2007;41(1):111-119.
24. Nascimento OV, Boleti APA, Yuyama LKO, Lima ES. Effects of diet supplementation with Camu-camu (*Myrciaria dúbia* HBK McVaugh) fruit in a rat model of diet-induced obesity. *An Acad Bras Cienc.* 2013;85(1):355-363.
25. Nascimento TB, Baptista RFF, Pereira PC, Campos DHS, Leopoldo AS, Leopoldo APL, Oliveira Júnior SA, Padovani CR, Cicogna AC, Cordelini S. Alterações vasculares em ratos obesos por dieta rica em gordura: papel da via l-arginina/NO endotelial. *Arq Bras Cardiol.* 2011;97(1):40- 45.
26. Ayoub HM, Mcdonald MR, Sullivan JA, Tsao R, Platt M, Simpson J, Meckling KA. The effect of anthocyanin-rich purple vegetable diets on metabolic syndrome in obese Zucker rats. *J Med Food.* 2017;20(12):1240-1249.
27. Rodrigo MG, Luis FP, Cynthia PNB, Camila QN, Bruna CC, Jacqueline NZ, Flávio AF, Silvano P, Paulo CFM, Renata L, João CPM, Júlio CO, Gustavo RP, Angela ASR, Alessandra LC, Maria RMN. Maternal diet-induced obesity during suckling period programs offspring obese phenotype and hypothalamic leptin/insulin resistance. *Cell Physiol Biochem.* 2017;42:1087-1097.
28. Ferreira LT, Saviolli IH, Vanlenti VE, Abreu LC. Diabetes melito: hiperglicemia crônica e suas complicações. *Arquivos Brasileiros de Ciências da Saúde.* 2011;36(3):182-8.
29. Magalhães DA, Kume WT, Correia FS, Queiroz TS, Allebrandt Neto EW, Santos MP, Kawashita NH, França SA. High-fat diet and streptozotocin in the induction of type 2 diabetes mellitus: a new proposal. *An Acad Bras Cienc.* 2019;91(1):e20180314.

30. Guo X, Wang Y, Wank K, Ji B, Zhou F. Stability of a type 2 diabetes rat model induced by high-fat diet feeding with low-dose streptozotocin injection. *J Zhejiang Univ Sci B*. 2018;19(7):559-569.
31. Bardocz, S, Grant G, Puzsai A. The effect of phytohaemagglutinin at different dietary concentrations on the growth, body composition and plasma insulin of the rat. *Br J Nutr*. 1996;76(4):613-626.
32. Silva TL, Rocha RAR, Alves LC, Rocha LCR, Ferreira CLR, Ribeiro MN, Cunha DP. Efeito da Ingestão de farinha de taioba sobre o peso corporal de ratos previamente alimentados com óleo de soja e banha suína. *Revista de Saúde e Biologia*. 2015;10(2):27-34.
33. Franco-Pérez J, Manjarrez-Marmolejo J, Ballesteros-Zebadúa P, Neri-Santos A, Montes S, Suarez-Rivera N, Hernández-Cerón M, Pérez-Koldenkova V. Chronic Consumption of Fructose Induces Behavioral Alterations by Increasing Orexin and Dopamine Levels in the Rat Brain. *Nutrients*. 2018;10(11):1722.
34. Hernández-Díazcouder A, Romero-Nava R, Carbó R, Sánchez-Lozada LG, Sánchez-Muñoz F. High Fructose Intake and Adipogenesis. *Int J Mol Sci*. 2019;20(11):2787.
35. Wang DD, Sievenpiper JL, Souza RJ, Cozma AI, Chiavaroli L, Ha V, Mirrahim A, Carleton AJ, Di Buono M, Jenkins AL, Leiter LA, Wolever TMS, Beyene J, Kendall CWC, Jenkins DJA. Effect of fructose on postprandial triglycerides: A systematic review and meta-analysis of controlled feeding trials. *Atherosclerosis*. 2014;232(1):125-133.
36. Kodama S, Horikawa C, Fujihara K, Ishii D, Hatta M, Takeda Y, Kitazawa M, Matsubayashi Y, Shimano H, Kato K, Tanaka S, Sone H. Relationship between intake of fruit separately from vegetables and triglycerides - A meta-analysis. *Clin Nutr ESPEN*. 2018;27:53-58.
37. Go HK, Rahman MM, Kim GB, Na CS, Song CH, Kim JS, Kim SJ, Kang HS. Antidiabetic effects of yam (*dioscorea batatas*) and its active constituent, allantoin, in a rat model of streptozotocin-induced diabetes. *Nutrients*. 2015;7(10):8532-8544.
38. Cersosimo E, Solis-Herrera C, Trautmann ME, Malloy J, Triplitt CL. Assessment of pancreatic beta-cell function: review of methods and clinical applications. *Curr Diabetes Rev*. 2014;10(1):2-42.
39. Yang DK, Kang HS. Anti-diabetic effect of cotreatment with quercetin and resveratrol in streptozotocin-induced diabetic rats. *Biomol Ther*. 2018;26(2):130-138.
40. Abdul-Ghani MA, Matsuda M, Balas B, DeFronzo RA. Muscle and liver insulin resistance indexes derived from the oral glucose tolerance test. *Diabetes care*. 2007;30(1):89-94.

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos de composição e testes de toxicidade realizados nos frutos de tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.), podemos concluir que a adição deste fruto na alimentação humana poderá contribuir significativamente na manutenção da saúde, tendo em vista que os frutos apresentaram teores apreciáveis de fibras, vitamina C, ferro, potássio, e ácidos graxos insaturados.

Ao avaliar a FT por meio de testes de toxicidade aguda e subaguda, observamos no teste oral agudo que o valor de LD50 pode ser considerado superior a 2000 mg/kg de peso corporal para a FT. E no teste oral subagudo não foram observados letalidade ou alteração dos sinais clínicos, peso corporal, consumo alimentar, peso de tecidos/órgãos, parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos em camundongos tratados com FT nas doses orais de 250, 500 e 1000 mg/kg por 28 dias. Concluindo que a introdução deste fruto na alimentação pode ser considerada segura, tendo em vista os resultados obtidos por meio do teste de toxicidade.

O presente trabalho ainda padronizou uma metodologia para indução de diabetes tipo 2 em ratos *Wistar*. Essa metodologia se mostrou eficiente em mimetizar as características metabólicas da doença em humanos (presença de polidipsia, hiperglicemia, testes bioquímicos alterados, resistência à insulina e danos ao fígado, pâncreas e rim), bem como não houve perda da animais durante o experimento. Esse método apresentou baixo custo para ser desenvolvido.

Finalmente, ao analisar os resultados obtidos de dados antropométricos, bioquímicos, teste de resistência à insulina e parâmetros histológicos no experimento que avaliou os efeitos metabólicos da FT em animais diabéticos tipo 2, observou-se que a suplementação de 2, 4 ou 8% de farinha de tucumã não se apresentou eficiente em reverter ou minimizar os efeitos metabólicos ocasionados pelo diabetes tipo 2.

7 REFERÊNCIAS

- AMARAL, L. A.; OLIVEIRA, R. J.; SANTOS, E. F. **Diretrizes para ensaios toxicológicos *in vivo*: uma revisão**. Corpo humano: a influência da ciência na saúde. 1ed.: UNIEDUSUL, 2019. p. 55-68.
- AMERICAN DIABETES ASSOCIATION. Standards of Medical Care in Diabetes - 2019 Abridged for Primary Care Providers. **Diabetes Care**, v. 37, n. 1, p. 11-34, 2019.
- ANVISA – Agência Nacional De Vigilância Sanitária. Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Brasília, 31 de janeiro de 2013.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria n. 31, de 13 de janeiro de 1998. 19 Regulamento técnico para fixação de identidade e qualidade de alimentos adicionados de nutrientes 20 essenciais. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, 16 de janeiro de 1998.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Guia alimentar para a população brasileira**. 2. ed., Brasília: Ministério da Saúde, 2014. 156 p.
- BOLFE, E. L.; SANO, E. E.; CAMPOS, S. K. Dinâmica agrícola no Cerrado: análises e projeções. Brasília, DF: Embrapa, 2020.
- BRANQUINHO, L. S.; SANTOS, J. A.; CARDOSO, C. A. L.; MOTA, J. S.; JUNIOR, J. L.; KASSUYA, C. A. L.; ARENA, A. S. Anti-inflammatory and toxicological evaluation of essential oil from Piper glabratum leaves. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 198, n. 1, p. 372–378, 2017.
- CALDEIRA, S. D.; HIANE, P. A.; RAMOS, M. I. L.; FILHO, M. M. R. Caracterização físico-química do araçá (*Psidium guineense* SW.) e do tarumã (*Vitex cymosa* Bert.) do estado de Mato Grosso do Sul. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos**, v. 22, n.1, p. 145-154, 2004.
- CASTRO, C. A.; SILVA, K. A.; BUFFO, M. M.; PINTO, K. N. Z.; DUARTE, F. O.; NONAKA, K. O.; ANÍBAL, F. F.; GARCIA, A. C.; DUARTE, G. O. Experimental type 2 diabetes induction reduces serum vaspin, but not serum omentin, in Wistar rats. **International Journal of Experimental Pathology**, v. 98, n. 1, p. 26-33, 2017.
- DERKACH, K. V.; BONDAREVA, V. M.; CHISTYAKOVA, O. V.; BERSTEIN, L. M.; SHPAKOV, A. The effect of long-term intranasal serotonin treatment on metabolic parameters and hormonal signaling in rats with high-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes. **International Journal of Endocrinology**, v. 2015, p. 1-17, 2015.
- DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; CARNEIRO, J. D. S. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, v. 134, n. 2012, p. 381-386, 2012.
- FERREIRA, E. S.; LUCIEN, V. G.; AMARAL, A. S.; SILVEIRA, C. S. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído de tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v. 19, n. 4, p. 427-433, 2008.

FRUMKIM, H.; HAINES, A. Global environmental change and noncommunicable disease risks. **Annual Review of Public Health**, v. 40, n. 1, 261-282, 2019.

GUIMARÃES, A. C. G. Potencial funcional e nutricional de farinhas de jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) e bacaba (*Oenocarpus bacaba*). 2013. 109 p. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Lavras/UFLA, Lavras, 2013.

HAMACEK, F. R.; MOREIRA, A. V. B.; MARTINO, H. S. D.; RIBEIRO, S. M. R.; PINHEIRO-SANT'ANA, H. M. Valor nutricional, caracterização física e físico-química de jenipapo (*Genipa americana* L.) do cerrado de Minas Geras. **Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 24, n.1, p. 73-77, 2013.

International Diabetes Federation. IDF Atlas. 8th ed. Bruxelas, Belgium: International Diabetes Federation; 2017.

KHARE, P.; DATUSALIA, A. K.; SHARMA, S. S. Parthenolide, an nf-jb inhibitor ameliorates diabetes-induced behavioural deficit, neurotransmitter imbalance and neuroinflammation in type 2 diabetes rat model. **Neuromolecular Medicine**, v. 19, n. 1, p. 101-112, 2017.

KOSS-MIKOŁAJCZYK, I.; BARANOWSKA, M.; TODOROVIC, V.; ALBINI, A.; SANSONE, C.; ANDREOLETTI, P.; CHERKAOUI-MALKI, M.; LIZARD, G.; NOONAN, D.; SOBAJIC, S.; BARTOSZEK, A. Prophylaxis of non-communicable diseases: why fruits and vegetables may be better chemopreventive agents than dietary supplements based on isolated phytochemicals?. **Current Pharmaceutical Design**, v. 25, n. 1, p. 1847-1860, 2019.

LENZEN, S. The mechanisms of alloxan- and streptozotocin-induced diabetes. **Diabetologia**, v. 51, p. 216–226, 2008.

LIMA, F. F.; TRAESEL, G. K.; MENEGATI, S. E. M. T.; SANTOS, A. C.; SOUZA, R. I. S.; OLIVEIRA, V. S. SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J.; CARDOSO, C. A. L.; OESTERREICH, S. A.; VIEIRA, M. C. Acute and subacute oral toxicity assessment of the oil extracted from *Attalea phalerata* Mart ex Spreng. pulp fruit in rats. **Food Research International**, v. 91, n. 1, p. 11-17, 2017.

LOPES, R. M.; DA SILVA, J. P.; VIEIRA, R. F.; DA SILVA, D. B.; DOMES, I. S.; AGOSTINI-COSTA, T. S. Composição de ácidos graxos em polpa de frutas nativas do Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 34, n. 2, p. 635-640, 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M.; COSTA, J. T. M.; CERQUEIRA, L. S. C.; FERREIRA, E. Palmeiras brasileiras exóticas e cultivadas. 1 ed. Plantarum, 2004, 432 p.

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

MATOS, K. A. N.; LIMA, D. P.; BARBOSA, A. P. P.; MERCADANTE, A. Z.; CHISTÉ, R. C. Peels of tucumã (*Astrocaryum vulgare*) and peach palm (*Bactris gasipaes*) are by-products classified as very high carotenoid sources. **Food Chemistry**, v. 272, p. 216-221, 2019.

MC RAE, M. P. Dietary Fiber Intake and Type 2 Diabetes Mellitus: An Umbrella Review of Meta-analyses. **Journal of Chiropractic Medicine**, v. 17, n. 1, p. 44-53, 2018.

MORAIS, M. L.; SILVA, A. C. R.; ARAÚJO, C. R. R.; ESTEVES, E. A.; DESSIMONI-PINTO, N. A. V. Determinação do potencial antioxidante in vitro de frutos do cerrado brasileiro. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 35, n. 2, p. 355-360, 2013.

MOREIRA-ARAÚJO, R. S. R.; BARROS, N. V. A.; PORTO, R. G. C. L.; BRANDÃO, A. C. A. S.; DE LIMA, A.; FETT, R. Bioactive compounds and antioxidant activity three fruit species from the Brazilian Cerrado. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 41, n. 3, p. 1-8, 2019.

NEGRI, G. Diabetes melito: plantas e princípios ativos naturais hipoglicemiantes. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol.41, n.2, p. 121-142, 2005.

NUNES, A. A.; BUCCINI, D. F.; JAQUES, J. A. S.; PORTUGAL, L. C.; GUIMARÃES, R. C. A.; 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.

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

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

PALOMER, X.; PIZARRO-DELGADO, J.; BARROSO, E.; VÁZQUEZ-CARRERA, M. Palmitic and Oleic Acid: The Yin and Yang of Fatty Acids in Type 2 Diabetes Mellitus. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 29, n. 3, p. 178-190, 2018.

PIMENTEL, V.; VIEIRA, V.; MITIDIERI, T.; FRANÇA, F.; PIERONI, J. P. Biodiversidade brasileira como fonte da inovação farmacêutica: uma nova esperança? **Revista do BNDDES**, v. 43, n. 1, p. 41-89, 2015.

QIAN, C.; ZHU, C.; YU, W.; JIANG, X.; ZHANG, F. High-fat diet/low-dose streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats impacts osteogenesis and wnt signaling in bone marrow stromal cells. *Plos One*, v. 10, n. 8, p. 1-15, 2015.

RAMOS, M. I. L.; RAMOS FILHO, M. M.; HIANE, P. A.; BRAGA NETO, J. A.; SIQUEIRA, E. M. A. Qualidade nutricional da polpa de bociúva *Acromia aculeata* (Jacq.) Lodd.. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 0, p. 90-94, 2008.

REED, M. J.; MESZAROS, K.; ENTES, L. J.; CLAYPOOL, M. D.; PINKETT, J. G.; GADBOIS, T. M.; REAVEN, G. M. A new rat model of type 2 diabetes: the fat-fed, streptozotocin-treated rat. **Metabolism Clinical and Experimental**, v. 49, n. 11, p. 1390-1394, 2000.

REHMAN, K.; HAIDER, K.; JABEEN, K.; AKASH, M. S. H. Current perspectives of oleic acid: Regulation of molecular pathways in mitochondrial and endothelial functioning against insulin resistance and diabetes. **Reviews in Endocrine and Metabolic Disorders**, v. 21, n. 4, p. 631-643, 2020.

RODRIGUES, A. M. C.; DARNET, S.; SILVA, L. H. M. Fatty acids profiles and tocoferol contents of Buriti (*Mauritia flexuosa*), Patawa (*Oenocarpus bataua*), Tucumã (*Astrocaryum*

vulgare), Mari (Poraqueiba paraensis) and Inaja (Maximiliana maripa) fruits. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 21, n. 10, p. 2000-2004, 2010.

ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z. Identification and quantification of carotenoids, by HPLC-PDA-MS/MS, from Amazonian Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 13, p. 5062-5072, 2007.

SALDANHA, G. B.; SALDANHA, G. B. SOUSA, M. R. C.; OLIVEIRA, G. L. S.; SILVA, A. P. S. C. L.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Absence of toxicity in Swiss mice following treatment with 7-acetoxy-4-aryl-3,4-dihydrocoumarin: Acute and repeated-dose toxicity study. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 94, p. 75–82, 2018.

SALES, A. L. C. C. Efeito da suplementação com aveia, linhaça, gergelim semente de girassol e jatobá sobre parâmetros relacionados ao diabetes mellitus em ratos. 2011. 98 f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) – Universidade Federal do Piauí/UFPI, Teresina, 2011.

SANTOS, M. F. G.; ALVES, R. E., BRITO, E. S.; SILVA, S. M.; SILVEIRA, M. R. S. Quality characterists of fruits and oils of palms native to the Brazilian Amazon. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 39, n. Spe, p. 1-6, 2017.

SANTOS, M. M. R.; FERNANDES, D. S.; CÂNDIDO, C. J.; CAVALHEIRO, L. F.; SILVA, A. F.; NASCIMENTO, V. A.; RAMOS FILHO, M. M.; SANTOS, E. F.; HIANE, P. A. Physical-chemical, nutritional and antioxidant properties of tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.) fruits. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 39, n. 4, p. 1517-1532, 2018.

SANTOS, P. D. F.; RUBIO, F. T. V.; BALIEIRO, J. C. C.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Application of spray drying for production of microparticles containing the carotenoid-rich tucumã oil (*Astrocaryum vulgare* Mart.). **LWT – Food Science and Technology**, v. 143, p. 111106, 2021.

SKOVSO, S. Modeling type 2 diabetes in rats using high fat diet and streptozotocin. **Journal of Diabetes Investigation**, v. 5, n. 4, p. 349-358, 2014.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2017-2018. São Paulo: Editora Clannad, 2017.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD). Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes 2019-2020. São Paulo: Editora Clannad, 2019.

SZKUDELSKI, T. The Mechanism of Alloxan and Streptozotocin Action in B Cells of the Rat Pancreas. **Physiological Research**, v. 50, p. 536-546, 2001.

TRAESEL, G. K.; SOUZA J. C.; 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**, v. 74, n. 1, p. 320-25, 2014.

WANG, H.; LI, H.; JIANG, X.; SHI, W.; SHEN, Z.; LI, M. Hepcidin is directly regulated by insulin and plays an important role in iron overload in streptozotocin-induced diabetic rats. **Diabetes**, v. 63, n. 5, p. 1506-1518, 2014.

WEICKERT, M. O.; PFEIFFER, A. F. H. Impact of Dietary Fiber Consumption on Insulin Resistance and the Prevention of Type 2 Diabetes. **The Journal of Nutrition**, v. 148, n. 1, p. 7-12, 2018.

ANEXO 1 - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – TESTES DE TOXICIDADE



Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, genotoxicidade e clastogenicidade do tucumã (*Astrocaryum huaimi* Mart.)", registrada com o nº 894/2017, sob a responsabilidade de **Elisvânia Freitas dos Santos** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 8ª reunião ordinária do dia 19/09/2017.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/11/2017 a 1º/11/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Mus musculus</i> / Swiss
Nº de animais	30 Macho + 40 Fêmea = 70
Peso/Idade	15 g / 21 dias
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Central/INBIO/UFMS

Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 20 de setembro de 2017.

ANEXO 2 - PROTOCOLO DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) – DIABETES TIPO 2



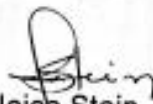
Serviço Público Federal
Ministério da Educação
Fundação Universidade Federal de Mato Grosso do Sul



C E R T I F I C A D O

Certificamos que a proposta intitulada "Avaliação da atividade hipoglicemiante da casca e polpa de tucumã em ratos diabéticos", registrada com o nº 895/2017, sob a responsabilidade de **Elisvânia Freitas dos Santos** - que envolve a utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS/CEUA DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL/UFMS, na 10ª reunião ordinária do dia 09/11/2017.

FINALIDADE	() Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da autorização	1º/11/2017 a 1º/11/2019
Espécie/Linhagem/Raça	<i>Rattus norvegicus</i> / Wistar
Nº de animais	115
Peso/Idade	50 - 70g / 21 dias
Sexo	Machos
Origem	Biotério Central/INBIO/UFMS


Joice Stein

Coordenadora da CEUA/UFMS
Campo Grande, 09 de novembro de 2017.