



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de Araçatuba

RAQUEL DE CÁSSIA PEREIRA

**ENSAIO TOXICOLÓGICO *IN VIVO* DA BIOMASSA DE
Rubrivivax gelatinosus EM RATAS**

ARAÇATUBA
2019

RAQUEL DE CÁSSIA PEREIRA

**ENSAIO TOXICOLÓGICO *IN VIVO* DA BIOMASSA DE
Rubrivivax gelatinosus EM RATAS**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina Veterinária – Unesp, Campus de Araçatuba, como parte das exigências para a obtenção do título de Doutora em Ciência Animal (Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal).

Orientadora: Prof^a Dr^a Elisa Helena Giglio Ponsano
Coorientadora: Prof^a Dr^a Daniela Bernadete Rozza
Coorientador: Prof. Dr. Fábio Erminio Mingatto

Araçatuba
2019

Catálogo-na-Publicação (CIP)
Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação – FMVA / UNESP

P436e Pereira, Raquel de Cássia.
Ensaio toxicológico in vivo da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* em ratas / Raquel de Cássia Pereira. – Araçatuba, 2019.
78 f.: tab.; il.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual Paulista,
Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba
Orientadora: Elisa Helena Giglio Ponsano
Coorientadora: Daniela Bernadete Rozza
Coorientador: Fábio Erminio Mingatto

1. Toxicologia 2. Biomassa 3. Alimentos aditivos 4.
Antioxidante I. Título

CDD 636.1

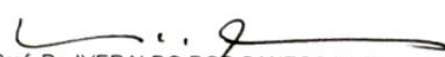
CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

Título: Ensaio toxicológico in vivo da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* em ratas


AUTORA: RAQUEL DE CÁSSIA PEREIRA
ORIENTADORA: ELISA HELENA GIGLIO PONSANO
COORDENADOR: FÁBIO ERMINIO MINGATTO
COORDENADORA: DANIELA BERNADETE ROZZA

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Doutora em CIÊNCIA ANIMAL, área: Medicina Veterinária Preventiva e Produção Animal pela Comissão Examinadora


Profa. Dra. ELISA HELENA GIGLIO PONSANO
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. IVERALDO DOS SANTOS DUTRA
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. KÁTIA DENISE SARAIVA BRESCIANI
Departamento de Apoio, Produção e Saúde Animal / Faculdade de Medicina Veterinária - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Profa. Dra. RITA CÁSSIA MENEGATI DORNELLES
Departamento de Ciências Básicas / Faculdade de Odontologia - Câmpus de Araçatuba/Unesp


Prof. Dr. ESTEVAO ZILIOI
Departamento de Ciências Exatas e Agrárias / Centro Universitário de Adamantina - UNIFAI

Araçatuba, 04 de junho de 2019.

DEDICATÓRIA

Aos meus amados pais, José Carlos Pereira e Altair Vendramin Pereira, meus exemplos de superação e coragem. Sem vocês, eu nada seria.

Ao meu querido irmão Fernando e a minha cunhada Eliana, que sempre me dão forças para continuar.

Ao meu companheiro de todos os momentos João Francisco Mugnai Neves e a nossa amada Zara.

Vocês são minha força para continuar lutando!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Prof.^a Dr.^a Elisa Giglio Ponsano, por tirar todas as dúvidas sempre que possível e me ajudar no que foi necessário. Um exemplo de comprometimento com seus orientados.

Aos meus coorientadores Prof. Dr. Fábio Mingatto e Prof.^a Dr.^a Daniela Rozza por tamanha dedicação de ambos, que nunca mediram esforços para ajudar. Vocês são exemplos de professores e mestres.

À Prof.^a Dr.^a Rita Cássia Menegati Dornellas por ceder gentilmente as gaiolas metabólicas para a realização deste experimento e ainda mostrar-se sempre pronta a ajudar. A senhora é um ser de luz.

À Joselaine de Oliveira e ao Carlos Alexandre de Souza pelo auxílio em todo o processo de produção da biomassa.

À querida Helenice Pires pelo apoio físico, mental e emocional neste trajeto.

À querida amiga Hyllana Medeiros, pelo apoio técnico e emocional.

Aos membros do Laboratório de Análises Clínicas Veterinárias Ariana e Ane e, em especial, ao Prof. Dr. Paulo César Ciarlini, que se mostrou pronto e solícito no auxílio, uma vez que doou seus kits para as análises deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Guilherme de Paula Nogueira do Laboratório de Endocrinologia Animal pelo apoio durante o experimento no biotério.

À Prof.^a Ass. Silvia H. Venturolli Perri por todo auxílio prestado nas análises estatísticas.

Ao Prof. Dr. Luiz Carlos Cunha por todo auxílio nos testes hipocráticos.

À querida Lilian Ultrabo que me deu um apoio imenso na fase mais crítica deste projeto.

À Luciana Prando, pela disponibilidade e ombro amigo nos momentos de desespero.

À equipe da Seção de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA-UNESP), por serem sempre prestativos.

À Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciência Animal da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba (FMVA-UNESP), em especial à pesquisadora Flávia Lombardi Lopes, pela oportunidade.

E, se não fiz jus a algum amigo que prestou apoio, o meu mais sincero obrigada!

PEREIRA, R. C. **Ensaio toxicológico *in vivo* da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* em ratas**. 2019. 78 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

RESUMO

A degradação da carga orgânica de efluentes pelo microrganismo fotossintetizante *Rubrivivax gelatinosus* resulta na produção de uma biomassa de valor nutricional e tecnológico, visto que possui proteínas e carotenoides. Tendo em vista a possibilidade de utilizar tal biomassa como um aditivo alimentício, o objetivo deste estudo foi avaliar a toxicidade aguda *in vivo* do produto em ratas *Wistar*. O estudo foi dividido em duas etapas, sendo uma com dosagem única e outra com dosagem repetida, ambas com 15 dias de duração. Na avaliação com dosagem única, 12 ratas da linhagem *Wistar* com peso acima de 200 g foram divididas aleatoriamente em 4 grupos (3 animais/grupo), para receber as diferentes dietas experimentais: C (controle – óleo de milho), B1 (300 mg de biomassa/kg), B2 (1000 mg de biomassa/kg) e B3 (2000 mg de biomassa/kg). Na avaliação com dosagem repetida, 15 ratas da linhagem *Wistar* foram divididas aleatoriamente em 5 grupos (3 animais/grupo) e receberam as seguintes dietas experimentais: RC (controle – óleo de milho), SAT (satélite – 300 mg de biomassa/kg), R1 (50 mg de biomassa/kg), R2 (100 mg de biomassa/kg) e R3 (300 mg de biomassa/kg). As doses da segunda avaliação foram estabelecidas após os resultados do primeiro teste. Em os ambos experimentos, os animais foram avaliados por dados fisiológicos (peso, consumo de ração e água, excretas e temperatura corporal), e comportamentais (*screening hipocrático*). Após a eutanásia foram tomados dados sobre o peso relativo de órgãos e a histopatologia de fígados e rins. Os parâmetros fisiológicos e dados *post mortem* foram avaliados por ANOVA seguida pelo teste de Dunnett para as comparações entre os grupos e resultados com $P < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados do *screening hipocrático* foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para a comparação de scores médios obtidos. Em ambos os experimentos, não foram encontradas alterações fisiológicas ou comportamentais ($P > 0,05$). Constatou-se degeneração e necrose de hepatócitos em animais que receberam dosagens acima de 1000 mg/kg. Os resultados indicaram que a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* apresenta baixa toxicidade (> 2000 mg/kg).

Palavras chave: Aditivos alimentar. Toxicologia. Fisiologia.

PEREIRA, R. C. **In vivo toxicological assay of the biomass of *Rubrivivax gelatinosus* in female rats.** 2019. 78 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina Veterinária, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2019.

ABSTRACT

The degradation of the organic load of effluents by the photosynthetic microorganism *Rubrivivax gelatinosus* results in the production of a biomass of nutritional and technological value, since it has proteins and carotenoids. Considering the possibility of using such biomass as a food additive, the objective of this study was to evaluate the *in vivo* acute toxicity of the product in Wistar female rats. The study was divided into two stages, one with a single dose and one with a repeated dosage, both with a 15-day duration. In the single - dose evaluation, 12 Wistar female rats weighing more than 200 g were randomly divided into 4 groups (3 animals / group) to receive the different experimental diets: C (control - corn oil), B1 (300 mg of biomass / kg), B2 (1000 mg of biomass / kg) and B3 (2000 mg of biomass / kg). In the evaluation with repeated dosage, 15 Wistar female rats were randomly divided into 5 groups (3 animals / group) and received the following experimental diets: CR (control - corn oil), SAT (satellite - 300 mg biomass / kg) , R1 (50 mg of biomass / kg), R2 (100 mg of biomass / kg) and R3 (300 mg of biomass / kg). The doses of the second evaluation were established after the results of the first test. In both experiments, the animals were evaluated by physiological data (weight, feed and water consumption, excreta and body temperature), and behavioral (hippocratic screening). After euthanasia, data were taken on the relative weight of organs and the histopathology of livers and kidneys. The physiological parameters and *post mortem* data were evaluated by ANOVA followed by the Dunnet test for comparisons between groups and results with $P < 0.05$ were considered statistically significant. The results of the hippocratic screening were submitted to the Kruskal-Wallis test for the comparison of average scores obtained. In both experiments, no physiological or behavioral changes were found ($P > 0.05$). Hepatocyte degeneration and necrosis were found in animals receiving dosages above 1000 mg / kg. The results indicated that the biomass of *Rubrivivax gelatinosus* presents low toxicity (> 2000 mg / kg).

Key words: Food additive. Acute toxicity. Physiology.

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS | 12 |
| 1.1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.2. REVISÃO DA LITERATURA | 14 |
| 1.2.1 Produtos de origem animal e geração de resíduos | 14 |
| 1.2.2 Tratamento biológico de efluentes e <i>Rubrivivax gelatinosus</i> | 15 |
| 1.2.3 Aplicação experimental da biomassa de <i>Rubrivivax gelatinosus</i> como aditivo alimentar | 17 |
| 1.2.4 Métodos para avaliação de toxicidade oral aguda e subaguda | 18 |
| 1.3 OBJETIVO | 21 |
| REFERÊNCIAS | 22 |
| CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA DA BIOMASSA DE <i>Rubrivivax gelatinosus</i> EM RATAS | 27 |
| Resumo | 27 |
| Abstract | 29 |
| 2.1 INTRODUÇÃO | 30 |
| 2.2 MATERIAIS E MÉTODOS | 31 |
| 2.2.1 Obtenção da biomassa | 31 |
| 2.2.2 Animais, delineamento experimental e tratamentos | 31 |
| 2.2.3 Observações fisiológicas e comportamentais | 32 |
| 2.2.4 Eutanásia, necropsia, biometria e análise histopatológica | 33 |
| 2.2.5 Análise estatística | 34 |
| 2.3 RESULTADOS | 35 |
| 2.3.1 Observações comportamentais | 35 |
| 2.3.2 Avaliações fisiológicas | 36 |
| 2.3.3 Biometria e histopatologia | 36 |
| 2.4 DISCUSSÃO | 38 |
| 2.5 CONCLUSÃO | 40 |
| REFERÊNCIAS | 41 |
| CAPÍTULO 3 – TOXICIDADE SUBAGUDA ORAL DA BIOMASSA DE <i>RUBRIVIVAX GELATINOSUS</i> POR DOSAGEM REPETIDA | 44 |
| Resumo | 44 |
| Abstract | 46 |
| 3.1 INTRODUÇÃO | 48 |
| 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS | 49 |
| 3.2.1 Produção da biomassa | 49 |
| 3.2.2 Animais | 49 |
| 3.2.3 Tratamentos e delineamento experimental | 49 |
| 3.2.4 Registro de parâmetros fisiológicos e comportamentais | 50 |

| | |
|--|----|
| 3.2.5 Eutanásia, necropsia e análise histopatológica | 50 |
| 3.2.6 Análises hematológicas e bioquímicas | 51 |
| 3.2.7 Análise estatística | 51 |
| 3.3 RESULTADOS | 52 |
| 3.3.1 Parâmetros fisiológicos e comportamentais | 52 |
| 3.3.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos | 52 |
| 3.3.3 Análises histopatológicas | 55 |
| 3.4 DISCUSSÃO | 56 |
| 3.5 CONCLUSÃO | 60 |
| REFERÊNCIAS | 61 |
| ANEXO A - Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais..... | |
| ANEXO B - Normas de publicação dos artigos - Food and Chemical Toxicology (Journal) | |

CAPÍTULO 1 – CONSIDERAÇÕES GERAIS

1.1 Introdução

O Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA) classifica o Brasil como um grande produtor mundial de proteína animal. Em 2017, o agronegócio contribuiu com U\$ 96,01 bilhões das exportações brasileiras, onde o setor cárneo contribuiu com U\$ 15,47 bilhões (MAPA, 2017). No entanto, essa atividade produtiva tem como consequência a geração de resíduos líquidos, chamados efluentes industriais. Para a visada sustentabilidade da cadeia produtiva de alimentos é fundamental que esses efluentes sejam tratados previamente ao descarte e, para isso, métodos biotecnológicos com o uso de bactérias fotossintetizantes podem ser aplicados (AVANÇO et al., 2014).

O micro-organismo *Rubrivivax gelatinosus* vem sendo utilizado experimentalmente para a redução da carga orgânica de efluentes industriais, gerando, adicionalmente, uma biomassa composta de proteínas contendo aminoácidos essenciais e pigmentos carotenoides (PONSANO et al., 2002, 2003, 2008). A bacterioclorofila *a* e os carotenoides do grupo esferoidene (esferoidene, hidroxiesferoidene e espiriloxantina) são os principais responsáveis pela coloração vermelho-púrpura desenvolvida em cultivos destes micro-organismos (PONSANO et al., 2002).

O potencial pigmentante da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* foi testado previamente por Polonio et al. (2010), Avanço et al. (2014) e Santo et al. (2016), que identificaram características importantes do ponto de vista tecnológico. Os autores verificaram que o uso do produto em ração de aves e peixes foi capaz de conferir coloração a gemas de ovos e à carne de frango e pescado, devido à presença dos carotenoides produzidos pela bactéria. Estes achados revestem-se de importância, uma vez que a cor de um produto alimentício influencia diretamente sua aceitação sensorial. Embora subjetiva, esta característica é fundamental na indução da sensação global sobre os alimentos (aroma, sabor e textura) (NETTO, 2009), incluindo-se os produtos de origem animal.

Além da propriedade pigmentante, Grassi et al. (2016a) avaliaram o efeito antioxidante da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* na alimentação de tilápias e

encontraram um retardamento na oxidação lipídica nos filés durante o armazenamento a -22 °C a partir de 20 dias, com estabilização aos 60 dias. O controle da oxidação dos lipídeos também foi atribuído pelos autores à presença dos carotenoides na biomassa da bactéria. Constatadas essas propriedades da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, Grassi et al. (2016b) recomendaram o uso do produto como aditivo alimentar para dietas animais. Em face de suas propriedades tecnológicas, levanta-se a possibilidade de aproveitá-la, também, como aditivo alimentar na elaboração de produtos para consumo humano.

Os aditivos alimentares são classificados quanto à sua obtenção em sintéticos ou naturais. Valduga et al. (2014) referem-se aos carotenoides como importantes corantes naturais utilizados em indústrias de alimentos, destacando sua produção biotecnológica. Estima-se em 80 o número de carotenoides sintetizados por bactérias fotossintetizantes e alguns fungos filamentosos, que ocorrem com base em uma característica importante: a utilização de meio de cultivo com custo inferior, tal como subprodutos industriais (UENOJO et al., 2007).

A principal discussão sobre o emprego de aditivos na produção de alimentos resulta da controvérsia entre a necessidade e a segurança de seu uso. Embora sob o ponto de vista tecnológico sejam alcançados benefícios com a utilização de aditivos alimentares, existe a preocupação constante quanto aos riscos toxicológicos potenciais decorrentes da ingestão diária dessas substâncias químicas (BRASIL, 1997). Por isso, testes toxicológicos são exigências para a aprovação de um potencial aditivo alimentar para consumo humano, uma vez que ele não deve trazer perigo ao consumidor quando ingerido (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

Os ensaios de toxicidade aguda são utilizados para avaliar a toxicidade produzida por uma substância quando administrada em uma ou mais doses durante um período não superior a 24 horas, e consistem na observação dos animais por 14 dias, no mínimo, após a administração. A análise serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas com doses repetidas (toxicidade subaguda), além de fornecer informações iniciais sobre o modo de ação da substância (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015; BRITO, 1994).

1.2 REVISÃO DA LITERATURA

1.2.1 Produtos de origem animal e geração de resíduos líquidos

O agronegócio brasileiro é uma das grandes forças que favorecem o crescimento do país, contribuindo com 22,5% de todo o PIB e 37% do mercado de trabalho do Brasil (2017). Dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (2017) demonstram a notoriedade brasileira na produção de proteína animal, com destaque para a carne bovina. O rebanho bovino brasileiro (215 milhões de cabeças de gado) supera a população (207 milhões de pessoas) e coloca o país na primeira posição em exportação dessa proteína de origem animal (IBGE, 2017).

A carne suína tem uma produção estável e pouco abaixo dos 4,0 milhões de toneladas ao ano (ABPA, 2017). A produção de frangos de corte se aproximou dos 14 milhões de toneladas no ano 2016, colocando o país na posição de 2º maior produtor mundial. Mais discretamente, aparece, a produção de pescado, que corresponde a 691.700 toneladas (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PSICULTURA, 2018).

Entretanto, em todo processo produtivo, há como resultante a geração de resíduos (ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY, 2002). De acordo com a Norma Brasileira (NBR) 9800/1987, resíduo líquido ou efluente é o despejo líquido proveniente de vários setores do estabelecimento industrial, que abrange todo o processamento da matéria-prima, águas poluídas de refrigeração, águas pluviais poluídas e esgoto doméstico (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1987)

Para realizar as diferentes etapas de processamento industrial – limpeza, cozimento, degelo, armazenamento, refrigeração, entre outros – grandes quantidades de água são necessárias, gerando um fluxo significativo de efluentes com elevadas concentrações de matéria orgânica (JEMLI et al., 2015). Por processarem diferentes produtos de origem animal, as agroindústrias geram os mais variados resíduos (EDVAN; CARNEIRO, 2011). Scarassati et al. (2003) estimaram que, para os abates bovino e suíno são despejados 2500 e 1200 litros de água, respectivamente, por cabeça, distribuídos por toda a cadeia produtiva, inclusive para a lavagem de

caminhões. Para aves, esse volume varia de 25 a 50 litros de água por cabeça. Nos entrepostos de pescados, estima-se o consumo de 230 litros de água por quilo de produto processado (SOUZA et al., 2008). Segundo a *Environmental Protection Agency* (2002), cerca de 80 a 95% da água consumida no processamento de carnes é descartada, compondo os efluentes líquidos.

Além do consumo de água na indústria de alimentos ser considerado elevado, o seu reaproveitamento é complexo, pois não existem parâmetros estabelecidos por legislação (MANCUSO; SANTOS, 2003). Somente são estabelecidos parâmetros para o descarte ou lançamento dos efluentes em cursos d'água que podem ser capazes de diluir a carga recebida sem maiores prejuízos (BRASIL, 2005).

Efluentes industriais tratados podem ser usados em operações de resfriamento e alimentação de caldeiras (LEVINE; ASANO, 2002). Rodrigues et al. (2017) consideram que é possível ao efluente de processamento de pescado atingir características de água potável, se tratamentos para diminuir carga orgânica e microbiológica forem empregados, podendo-se até considerar o reuso no mesmo processo. O importante, segundo o *Codex Alimentarius Commission* (2001), é que a segurança da água deve ser adequada ao objetivo proposto.

1.2.2 Tratamento biológico de efluentes e *Rubrivivax gelatinosus*

Conforme a NBR ISO 14001 (ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS, 1996), os impactos ambientais representam o efeito de uma ação humana sobre o meio ambiente em seus vários aspectos. Essas alterações compreendem emissões atmosféricas, resíduos, efluentes líquidos, consumo de matérias-primas, energia, água, entre outras.

Os principais impactos ambientais da indústria processadora de carne e derivados estão ligados não somente ao alto volume de efluente produzido mas, também, à sua alta carga poluidora, principalmente orgânica e microbiológica. Por isso, o conhecimento das características dos efluentes é essencial para projetar um sistema de tratamento (NAGASHIMA et al., 2012).

O tratamento de efluentes geralmente inclui processos químicos, físicos e biológicos. Esses últimos são realizados por um consórcio de micro-organismos

naturalmente presentes no ambiente ou especialmente adicionados ao efluente a ser tratado, com a intenção de aumentar a eficiência do processo (PONSANO et al., 2011). Trata-se de um processo metabólico natural realizado por micro-organismos que possuem a capacidade de reduzir a carga poluente, já que degradam compostos químicos contendo nitrogênio e carbono (NAGASHIMA et al., 2012).

Campos et al. (2018) comprovaram a viabilidade de microalgas na descontaminação de efluentes urbanos e dejetos líquidos da suinocultura, caracterizando o processo como sustentável e econômico. Santana et al. (2016) estudaram a biorremediação de águas residuárias de indústria têxtil por macrofungos e encontraram resultados favoráveis, que permitiram realizar recomendações quanto às espécies mais indicadas à proposta. Micro-organismos específicos podem ser empregados em processos biotecnológicos para o tratamento de efluentes e, conseqüentemente, para a obtenção de biomassa microbiana como subproduto metabólico (NAGASHIMA et al., 2012).

Um exemplo disso é *Rubrivivax gelatinosus*, uma bactéria púrpura não sulfurosa, que possui como habitat natural ambientes aquáticos variáveis, tais como efluentes industriais. Esta bactéria produz como pigmentos fotossintetizantes a bacterioclorofila *a* e os carotenoides do grupo esferoidene (esferoidene, hidroxiesferoidene e espiriloxantina), que são os principais responsáveis pela coloração vermelho-púrpura desenvolvida em cultivos destes micro-organismos (PONSANO et al., 2002). Utilizando *Rubrivivax gelatinosus* para o tratamento biológico do efluente de processamento de tilápia, Ponsano et al. (2011) encontraram uma diminuição de 52% na demanda química de oxigênio, 48% em óleos e 22% no nitrogênio total. Esse recurso biotecnológico é recomendado pela comunidade científica como uma alternativa viável para o tratamento de efluentes industriais (GAYLARDE et al., 2005).

Ponsano et al. (2002) e Ponsano et al. (2003) produziram biomassa da bactéria *Rubrivivax gelatinosus* a partir do efluente de processamento de pescado e identificaram em sua composição, além dos carotenoides, proteínas com quantidades balanceadas de aminoácidos essenciais, carboidratos, lipídeos e cinzas, o que levantou o interesse em sua aplicabilidade em alimentação animal, com o intuito de levar benefícios aos produtos derivados (AVANÇO et al., 2014; GRASSI et al., 2016a; GRASSI et al., 2016b; SANTO et al., 2016).

Produzir de maneira sustentável é primordial na atualidade, sendo o tratamento biológico uma realidade importante pois, além de resolver um problema ambiental de maneira natural, ainda traz consigo a possibilidade de produção de compostos com aplicabilidade no mercado (LIMA et al., 2011).

1.2.3 Aplicação experimental da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* como aditivo alimentar

A biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* foi amplamente estudada (PONSANO et al., 2002, 2003, 2004; PRASERTSAN et al., 1993), revelando ter valor nutricional e pigmentante e justificando sua aplicação na suplementação de dietas animais (AVANÇO et al., 2014; GRASSI et al., 2016b; SANTO et al., 2016).

O uso experimental da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* na dieta de frangos de corte por Oliveira et al. (2016) aumentou a concentração de ácidos graxos poli-insaturados ômega-3 na carne do peito dos animais. Avançaço et al. (2014) verificaram uma melhora na cor da pele da coxa e do peito de frangos de corte adicionando biomassa bacteriana na dieta desses animais. Ponsano et al. (2004) e Polonio et al. (2010) obtiveram resultados favoráveis para a pigmentação das gemas quando incluíram a biomassa bacteriana na dieta de poedeiras.

Santo et al. (2016) identificaram aumento no conteúdo proteico e na tonalidade vermelha de filés de tilápias tratadas com biomassa na dieta. Os autores também identificaram uma diminuição na oxidação lipídica da carne durante o armazenamento. Grassi et al. (2016b) observaram que a suplementação de tilápias com a biomassa não alterou parâmetros produtivos e trouxe benefícios para a carne, como o aumento na concentração de carotenoides e na proporção de ácidos graxos n-6 e n-3.

Embora já seja amplo o conhecimento tecnológico decorrente da suplementação animal com biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* (AVANÇO et al., 2014; PONSANO et al., 2004; SANTO et al., 2013) e, mesmo que o produto seja constituído por organismos vivos inócuos, sua caracterização toxicológica deve ser efetuada, para possibilitar uma futura aplicação em dietas humanas.

1.2.4 Métodos para avaliação de toxicidade oral aguda e subaguda

A toxicologia avalia a probabilidade da ocorrência de efeitos adversos decorrentes da exposição a determinada substância e em quais condições ela pode causar danos. Desse modo, sempre que for lançado um novo produto que terá contato direto com o homem, tais como medicamento, agrotóxico, aditivos alimentares, entre outros, devem ser realizados estudos para conhecer os riscos toxicológicos dessa nova substância (AZEVEDO, 2010).

A determinação da toxicidade aguda de uma substância-teste é fundamental para a obtenção de informações acerca dos riscos resultantes da exposição dos animais a ela por um curto período tempo e, também, serve de base para o estabelecimento de um regime de doses para as pesquisas de toxicidade subcrônica, toxicidade crônica e toxicidade com doses repetidas (BRITO, 1994).

Os modelos biológicos são as principais fontes de informações para identificar e caracterizar danos que podem ser provocados ao homem por substâncias presentes em alimentos (DE OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010). A preocupação com o bem-estar animal gerou uma movimentação mundial em direção à regulamentação de práticas para o uso de animais em atividades didáticas ou científicas. A Lei nº 11.794 de 2008, que estabelece procedimentos para o uso científico de animais no Brasil determina que o número de animais utilizados para a execução de um projeto e o tempo de duração dos experimentos sejam o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, a fim de se poupar, ao máximo, o animal do sofrimento (BRASIL, 2008). A Resolução Normativa do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) nº 17 de 2014 dispõe sobre a utilização de métodos alternativos com a finalidade de substituir, reduzir ou refinar o uso de animais em atividades de pesquisa (BRASIL, 2014).

Dentre os métodos alternativos aprovados pelo CONCEA está o Método OECD TG 423, destinado à determinação da Toxicidade Aguda Oral - Classe Tóxica Aguda (BRASIL, 2014). O método foi desenvolvido pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) com o intuito de reduzir o número de animais em estudo, pré-fixar doses de substâncias desconhecidas para a realização de testes e avaliar o efeito tóxico agudo causado por uma única exposição/dose (OECD, 2001). O método utiliza três animais de um único sexo por etapa e, dependendo da

mortalidade e/ou do estado moribundo dos animais, em média 2 a 4 etapas permitem o julgamento da toxicidade aguda da substância teste. Os resultados são medidos por avaliações biométricas e permitem a classificação da substância teste de acordo com o Sistema Globalmente Harmonizado (GHS), utilizado para a classificação de toxicidade aguda (OECD, 2001).

O Método 423 da OECD não foi concebido para o cálculo preciso da dose letal (DL50), mas sim para a sua classificação no sistema GHS e identificação de dosagens para testes posteriores. Para estimar com precisão a DL50, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), órgão regulador com a função de promover o controle sanitário da produção e do consumo de produtos e serviços submetidos à Vigilância Sanitária, sugere a adoção da metodologia proposta pela Sociedade Brasileira de Ciência em Animais de Laboratório/Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (ANVISA, 2015).

A ANVISA toma como base o princípio da análise de risco para autorizar a utilização de aditivos e coadjuvantes de tecnologia em alimentos e, por isso, estabelece que todo e qualquer aditivo alimentício, seja de origem artificial ou natural, deve ter definida sua Ingestão Diária Aceitável (IDA). A IDA é o parâmetro que avalia o risco causado pela exposição humana a substâncias químicas da dieta com relação ao peso corpóreo, ou seja, a quantidade que pode ser ingerida diariamente por toda a vida sem risco apreciável. A IDA deve ser estabelecida em unidades de miligrama por quilo de peso corpóreo (mg/kg p.c.) (DE OLIVEIRA; OLIVEIRA, 2010).

O Método OECD 407 fornece informações sobre os riscos que podem surgir em decorrência da administração repetida da substância de interesse durante um período de tempo limitado, incluindo efeitos sobre os sistemas nervoso, imune e endócrino (OECD, 2008). Neste protocolo, o composto teste é administrado por gavagem, pela dieta ou pela água potável para vários grupos de animais (preferencialmente ratos), onde cada grupo recebe uma determinada dose, durante 28 dias. Sinais de toxicidade devem ser pesquisados diariamente e o relatório do estudo inclui resultados de observações funcionais, peso corporal e medidas de consumo de alimentos/água, hematologia e bioquímica, bem como necropsia grosseira e histopatologia (OECD, 2008).

As informações aqui compiladas a respeito do potencial pigmentante da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* apontam para a viabilidade de sua utilização em rações animais. A obtenção de dados sobre a toxicidade da biomassa permitirá a

utilização do produto com segurança em animais e abrirá a possibilidade de utilização em dietas humanas.

1.3 OBJETIVO

Este trabalho teve como objetivo investigar as toxicidades aguda e subaguda da biomassa da bactéria *Rubrivivax gelatinosus* em ratas, de forma a explorar a possibilidade de seu uso como um aditivo alimentar de origem natural.

REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia de procedimentos para pedidos de inclusão e extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação na legislação brasileira.** 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Guia+de+Procedimentos+para+Pedidos+de+Inclus%C3%A3o+e+Extens%C3%A3o+de+Uso+de+Aditivos+Alimentares+e+Coadjuvantes+de+Tecnologia+de+Fabrica%C3%A7%C3%A3o+na+Legisla%C3%A7%C3%A3o+Brasileira.pdf/ad2f1a36-276c-4115-ba6b-62ccf3305400>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS - ABNT. **Norma NBR-9800:** critérios para lançamento de efluentes líquidos industriais no sistema coletor público de esgoto sanitário. Rio de Janeiro, 1987.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL. **Relatório anual de estatística da entidade nacional da avicultura e suinocultura do Brasil.** São Paulo, 2015. Disponível em: <<http://abpa-br.com.br/files/publicacoes/c59411a243d6dab1da8e605be58348ac.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DA PSICULTURA. **Anuário Brasileiro da Piscicultura PEIXE BR.** São Paulo, 2018. Disponível em: <<https://www.peixebr.com.br/Anuario2018/AnuarioPeixeBR2018.pdf>>. Acesso em: 02 jul. 2019.

AVANÇO, S. V.; PONSANO, E. H. G.; GARCIA-NETO, M.; PINTO, M. F. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* na criação de frangos de corte: desempenho animal e cor dos produtos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.66, p.1831-1838, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/1678-7305>>. Acesso em: 05 jul. 2018.

AZEVEDO, F. A. A toxicologia e o futuro. **Rev. Intertox. Toxicol.**, Salvador, v.3, n.3, p.4-17, 2010.

BRASIL. Ministério da Pesca e Aquicultura. 2013. **1º Anuário Brasileiro da Pesca e Aquicultura.** 2014. Disponível em: <http://formsus.datasus.gov.br/novoimgarq/16061/2489520_218117.pdf>. Acesso em: 15 jan. 2018.

BRASIL. Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008. Regulamenta o inciso VII do § 1º do art. 225 da Constituição Federal, estabelecendo procedimentos para o uso científico de animais; revoga a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979; e dá outras providências. **Diário Oficial da União.** Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm>. Acesso em: 9 jan. 2018.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Balança Comercial do Agronegócio**. Brasília: MAPA, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificações e emprego. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/PORTARIA_540_1997.pdf/3c55fd22-d503-4570-a98b-30e63d85bdad>. Acesso em: 9 jan. 2017.

BRASIL. Resolução CONAMA 357, de 17 de março de 2005. Conselho Nacional de Meio Ambiente. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <http://pnqa.ana.gov.br/Publicacao/RESOLUCAO_CONAMA_n_357.pdf>. Acesso em: 29 mar. 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal. Resolução Normativa nº 17, de 03 de julho de 2014. **Diário Oficial da União**. Disponível em: <http://www.lex.com.br/legis_25707022_RESOLUCAO_NORMATIVA_N_17_DE_3_DE_JULHO_DE_2014.aspx>. Acesso em: 12 jan. 2017.

BRITO, A. S. **Manual de ensaios toxicológicos In Vivo**. Campinas: Unicamp, 1994. 122p.

CAMPO, R. F.; WENDLING, C. S.; MATIAS, C. A. Utilização de microalgas no processo de tratamento de efluentes: biorremediação e sua interação. **Rev. Uniplac**. v.6, n.1, 2018.

CODEX ALIMENTARIUS. Codex Alimentarius Commission: Codex Committee on Food Hygiene. **Proposed Draft Guidelines for the Hygienic Reuse of Processing Water in Food Plants**. Joint FAO/WHO Foods Standards Programme, 34th Session, Bangkok, Thailand, 8-3 October 2001.

DE OLIVEIRA, F. A.; OLIVEIRA, F. C. **Toxicologia experimental de alimentos**. Porto Alegre: Sulina; Editora Universitária Metodista IPA, 2010.

DE OLIVEIRA, J.; AVANÇO, S. V.; GARCIA-NETO, M.; PONSANO, E. H. G. Composition of broilers meat. **J. Appl. Poult. Res.** v.25, p.173-181. 2016.

EDVAN, R. L.; CARNEIRO, M. S. S. Uso da digestiva bovina como adubo orgânico. **Appl. Res. Agrotec.**, v.4, n.2, p.211-225, 2011.

ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY - EPA. Development document for the proposed effluent limitations guidelines and standards for the meat and poultry products industry point source category. **Office of Water Mail Code 4303 T**. Washington, 2002.

ERASO, J. M.; KAPLAN, S. **Photoautotrophy**. Encyclopedia of Life Sciences, 2001.

GAYLARDE, C. C.; BELLINASSO, M. L.; MANFIO, G. P. Biorremediação – aspectos biológicos e técnicos da biorremediação de xenobióticos. **Biotecnologia Ciênc. Desenvolv.**, n.34, p.36-43, 2005.

GRASSI, T. L. M.; MARCOS, M. T. S.; PONSANO, E. H. G. Control of the lipid oxidation in Nile tilapia feed. **Ciênc. Rural**, v.46, n.9, p.1675-1677, 2016a.

GRASSI, T. L. M.; SANTO, E. F. E.; MARCOS, M. T. S.; CAVAZZANA, J. F.; OLIVEIRA, D. L.; BOSSOLANI, I. L. C.; PONSANO, E. H. G. Bacterial pigment for Nile tilapia feeding. **Aquacult Int.**, v.24, p. 647-660, 2016b.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA - IBGE. **Pesquisa trimestral do abate de animais**. 2017. Disponível em: <<https://www.ibge.gov.br/estatisticas-novoportal/economicas/agricultura-e-pecuaria/9203-pesquisas-trimestrais-do-abate-de-animais.html?=&t=o-que-e>>. Acesso em: 29 mar. 2018.

JEMLI, M.; KARRAY, F.; FEKI, F.; LOUKIL, S.; MHIRI, N.; ALOUI, F.; SAYADI, S. Biological treatment of fish processing wastewater: a case 2 study from Sfax City (Southeastern Tunisia). **J. Environ. Sci.**, v.30, p.102-112, 2015.

LEVINE, D. A.; ASANO, T. Water reclamation, recycling and reuse in industry, In: LENS, P.; HULSHOFF, P. L.; WILDERER, P.; ASANO, T. (Ed.). **Water recycling and resource recovery in industry: Analysis, technologies and implementation**. London: IWA Publishing, 2002. p.29-52.

LIMA, L. K. F.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F. Cultivation of *Rubrivivax gelatinosus* in fish industry effluent for depollution and biomass production. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.27, n.11, p.2553-2558, 2011.

MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H. F. A escassez e o reuso de água em âmbito mundial. In: **Reúso de água**. MANCUSO, P. C. S.; SANTOS, H. F.; PHILIPPI JUNIOR, A. (coord.). Barueri: Manole, 2003. 18p.

NAGASHIMA, S.; KAMIMURA, A.; SHIMIZU, T.; NAKAMURA-ISAKI, S.; AONO, E.; SAKAMOTO, K.; ICHIKAWA, N.; NAKAZAWA, H.; YAMAZAKI, S.; FUJITA, N.; SHIMADA, K.; HANADA, S.; NAGASHIMA, K. V. Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144. **J. Bacteriol.**, v.194, n.13, p.3541-3542, 2012.

NETTO, R. C. M. Dossiê corantes. **Food Ingred.**, n. 9, 2009. Disponível em: <<http://www.revista-fi.com/materias/106.pdf>>. Acesso em: 05 dez. 2016.

Organization for Economic Cooperation and Development: OECD Guideline for testing of chemicals. **Acute oral toxicity- acute toxic class method, guideline no. 423**. Rome 2001. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oeed/oeed_gl423.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2016.

Organization for Economic Cooperation and Development: OECD. **Test no. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**. Rome 2008. Disponível em:

<<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/ocedtg407-2008.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

POLONIO, L. B.; PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M. Utilization of bacterial (*Rubrivivax gelatinosus*) biomass for egg yolk pigmentation. **Anim. Prod. Sci.** v.50, p.01-05, 2010.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA NETO, M.; LACAVA, P. M. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler chicken pigmentation. **J. Appl. Poult. Res.**, v.11, n.1, p.77-82, 2002.

PONSANO, E. H. G.; PINTO, M. F.; GARCIA-NETO, M.; LACAVA, P. M. Performance and color of broilers fed diets containing *Rhodocyclus gelatinosus* biomass. **Braz. J. Poultry Sci.**, v.6, p.237-242, 2004.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.46, p.143-147, 2003.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M.; PINTO, M. F. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.45, p.445-449, 2002.

PONSANO, E. H. G.; PAULINO, C. Z.; PINTO, M. F. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. **Bioresour. Technol.**, v.99, p.3836-3842, 2008.

PONSANO, E. H. G.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C. From a pollutant by product to a feed ingredient. In: MATOVIC, D. (Ed) **Biomass: detection, production and usage**. Rijeka: Intech, 2011. p. 461-472.

PRASERTSAN, P.; CHORIT, W.; SUWANNO, S. Isolation, Identification and growth condition of photosynthetic bacteria found in seafood processing wastewater. **World J. Microbiol. Biotechnol.**, v.9, p.590- 593, 1993.

RODRIGUES, L. M.; FERRACIOLLI, V. D.; DE BEM LUIZ, D.; NAVAL, L. P. Potential for reuse of effluent of fish-processing industries. **Rev. Ambient. Água**, v.12, n.5, 2017.

SANTANA, M. D. F.; RODRIGUES, L. S. I., AMARAL, T. S.; PINHEIRO, Y. G. Fenoxidase e biodegradação do corante têxtil azul brilhante de remazol R (RBBR) para três espécies de macrofungos coletadas na amazônia. **SaBios: Rev. Saúde e Biol.**, v.11, n.2, p.53-60, 2016.

SANTO, E. F. E. ; GRASSI, T. L. M. ; MACOS, M. T. S. ; OLIVEIRA, D. L. ; CAVAZZAN, J. F., CIARLINI, P. C.; NARCISO, L. G., TORRES, A. A. ; GONÇALVES, G. S. ; ABIMORA, E. G. ; PONSANO, E. H. G. Desempenho, sanidade animal e qualidade de filés de tilápias alimentadas com ração suplementada com biomassa bacteriana. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.68, n.2, p. 525-534, 2016. Disponível em:<<http://www.scielo.br/pdf/abmvz/v68n2/0102-0935-abmvz-68-02-00525.pdf>>. Acesso em: 26 dez. 2016.

SANTO, E. F. E.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E. H. G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Sci. Technol.**, v.33, n.1, p.47-51, 2013.

SCARASSATI, D.; CARVALHO, R. F.; DELGADO, V. L.; CONEGLIAN, C. M. R.; BRITO, N. N.; TONSO, S.; SOBRINHO, G. D.; PELEGRINI, R. **Tratamento de efluentes de matadouros e frigoríficos**. In FÓRUM DE ESTUDOS CONTÁBEIS, [online], 3., 2003. Claretianas: editor, 2003. Disponível em: <<http://www.ctec.ufal.br/professor/elca/TRATAMENTO%20DE%20EFLUENTES%20DE%20MATADOUROS%20E%20FRIGOR%C3%8DFICOS.pdf>>. Acesso em: 02 nov. 2011.

SOUZA, M. A.; VIDOTTI, R. M.; OLIVEIRA NETO, L. A. Redução no consumo de efluente gerado em abatedouro de tilápia do nilo através da implantação de conceitos de produção mais limpa (P+L). **Bol. Instit. Pesca**, v.34, n.2, p.289-296, 2008.

UENOJO, M.; MAROSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Carotenóides: propriedades, aplicações e biotransformação para formação de compostos de aroma. **Quím. Nova**, v.30, n.3, p.616-622, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0100-40422007000300022&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 15 ago. 2017.

VALDUGA, E.; RIBEIRO, A. H. R.; CENCE, K.; COLET, R.; TIGGEMANN, L.; ZENI, J.; TONIAZZO, G. Carotenoids production from a newly isolated *Sporidiobolus pararoseus* strain using agroindustrial substrates. **Biocatal. Agric. Biotechnol.**, v.3, n.2, p.207-213, 2014.

CAPÍTULO 2 - AVALIAÇÃO DE TOXICIDADE AGUDA DA BIOMASSA DE *Rubrivivax gelatinosus* EM RATAS

RESUMO

A degradação da carga orgânica de efluentes pela bactéria *Rubrivivax gelatinosus*, além de cumprir com a finalidade despoluente, resulta na produção de uma biomassa de valor tecnológico, que possui carotenoides e que podem atuar como substâncias pigmentantes e antioxidantes em rações animais. O objetivo deste estudo foi investigar a toxicidade *in vivo* da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*. Ratas da linhagem Wistar com peso acima de 200 g foram divididas aleatoriamente para administração, em dosagem única, por gavagem, os seguintes tratamentos: grupo controle (óleo de milho), B1 (300 mg de biomassa/kg de peso corpóreo), B2 (1000 mg de biomassa/kg de peso corpóreo) e B3 (2000 mg de biomassa/kg peso corpóreo), sendo o óleo de milho a via de administração da biomassa. As doses foram determinadas de acordo com *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) para teste de dose aguda tóxica (Diretriz 423). Parâmetros biométricos (peso dos animais e dos órgãos), fisiológicos (consumo de ração e água, produção de excretas, temperatura) e comportamentais (*screening* hipocrático) foram monitorados durante 15 dias. Análises macroscópicas e histopatológicas de fígados e rins foram realizadas em todos os animais. Os parâmetros fisiológicos e biométricos foram analisados por ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para a comparação dos grupos tratados com o grupo controle. Os resultados do *screening* hipocrático foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para a comparação dos scores médios obtidos. Os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Dos parâmetros avaliados, apenas a produção de urina variou significativamente para o grupo B2. A análise comportamental não indicou comprometimento visível dos sistemas respiratório e nervoso dos animais. Os rins não apresentaram alterações microscópicas, porém foram observadas degeneração e necrose de hepatócitos nos animais o grupo de maior dosagem (B3). A ausência de óbitos e de alterações biométricas, fisiológicas e comportamentais permitiu classificar a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* na categoria 5 do Sistema Globalmente Harmonizado de Classificação e Rotulagem de Produtos Químicos, com DL50 > 2000 mg/kg peso corporal.

PALAVRAS CHAVE: Aditivo alimentar. Toxicologia. Fisiologia.

CHAPTER 2 - EVALUATION OF ACUTE TOXICITY OF THE BIOMASS OF *Rubrivivax gelatinosus* IN FEMALE RATS

ABSTRACT

The degradation of the organic effluent load by the bacterium *Rubrivivax gelatinosus*, besides complying with the non pollutant purpose, results in the production of a biomass of technological value, since it has carotenoids that can act as pigment substances and antioxidants in animal feed. The objective of this study was to investigate the *in vivo* toxicity of *Rubrivivax gelatinosus* biomass. Wistar female rats weighing more than 200 g were randomly divided into two groups: control group (corn oil), B1 (300 mg biomass / kg body weight), B2 (1000 mg of biomass / kg of body weight) and B3 (2000 mg of biomass / kg body weight), corn oil being the route of administration of the biomass. Doses were determined according to the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) for toxic acute dose testing (Guideline 423). Biometric parameters (weight of animals and organs), physiological (feed and water consumption, excreta production, temperature) and behavioral (hippocratic screening) parameters were monitored for 15 days. Macroscopic and histopathological analyzes of livers and kidneys were performed in all animals. The physiological and biometric parameters were analyzed by ANOVA followed by the Dunnet test to compare the groups treated with the control group. The results of the hippocratic screening were submitted to the Kruskal-Wallis test to compare the average scores obtained. The results with $p < 0.05$ were considered statistically significant. Of the biometric parameters evaluated, only the production of urine varied significantly for group B2. Behavioral analysis did not indicate visible impairment of the respiratory and nervous systems of the animals. The kidneys showed no microscopic changes, but degeneration and necrosis of hepatocytes were observed in the animals in the higher dose group (B3). The absence of biometric, physiological and behavioral changes and deaths made it possible to classify the biomass of *Rubrivivax gelatinosus* in category 5 of the Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals with LD50 > 2000 mg / kg body weight.

Key words: Food additive. Toxicology. Physiology.

2.1 INTRODUÇÃO¹

O Brasil é destaque no setor agroindustrial, sendo umas das três maiores potências mundiais em produção de proteína animal, segundo a Associação Brasileira de Proteína Animal (2015). Esse cenário positivo traz consigo um outro lado: a geração de efluentes resultantes do processamento (AVANÇO et al., 2014). Do montante total de água doce utilizado pela indústria de alimentos e bebidas, 24% é utilizado pela indústria de processamento de carne (GERBENS-LEENES et al., 2013), gerando um fluxo de água residual significativo, com elevadas concentrações de poluentes (JEMLI et al., 2015), o que demanda tratamento para permitir o descarte (GERBENS-LEENES et al., 2013).

O tratamento biológico de efluentes nas atividades produtivas deve ser considerado, visando alcançar sustentabilidade no processo produtivo (NAGASHIMA et al., 2012). A bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus* foi testada como agente biológico para a redução da carga orgânica de efluentes industriais, mostrando-se efetiva para essa finalidade. Além disso, nesse processo, a bactéria produziu uma biomassa composta, principalmente, de proteínas e carotenoides (PONSANO et al., 2003). Ponsano et al. (2002, 2003, 2008) identificaram o potencial tecnológico da biomassa de *R. gelatinosus*, testando seu uso na alimentação animal com a finalidade de promover pigmentação para os produtos finais. No entanto, visando a ampliação do uso da biomassa em dietas humanas, faz-se necessário testar sua não toxicidade.

A metodologia de avaliação de toxicidade aguda é aplicada para classificar substâncias quanto à sua capacidade de promover danos agudos aos organismos vivos (ZATTA et al., 2009) e é indicada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA como um teste inicial para certificar a segurança do uso de aditivos alimentares e coadjuvantes tecnológicos (ANVISA, 2015). Para tanto, a ANVISA recomenda a metodologia preconizada pela *Organization for Economic Cooperation and Development* (OECD) para teste de dose aguda tóxica (Diretriz 423). A fim de complementar as informações na literatura acerca da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, este estudo objetivou avaliar o potencial toxicológico agudo do produto, conforme preconizado pela ANVISA.

¹ Este artigo será submetido à publicação no Food and Chemical Toxicology (Journal)

2.2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.2.1 Obtenção da biomassa

O efluente de indústria de processamento de tilápias (Royal Fish/ Buritama-SP) foi utilizado como substrato para a obtenção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* (PONSANO et al., 2011). Após o período de crescimento bacteriano (sete dias / 30 °C ± 5 °C, luminosidade de 2000 ± 500 lux), o cultivo foi concentrado por filtração tangencial e centrifugação e transformado em pó por atomização (*spray drying*) (SANTO et al., 2013). A caracterização bromatológica foi realizada pelo mesmo autor (SANTO et al., 2013) e ficou evidenciada uma grande concentração de proteínas (aproximadamente 55%), sendo esta uma característica singular de produtos de bactérias fotossintetizantes (PONSANO et al. 2003).

2.2.2 Animais, delineamento experimental e tratamentos

O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no uso de animais (CEUA-FOA nº 00218-2017, ANEXO A). Foram utilizadas doze ratas da linhagem Wistar (pesando acima de 200 g) provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”.

Tabela 1 - Tratamentos do estudo de toxicidade aguda – Método de classes (OECD, 2002)

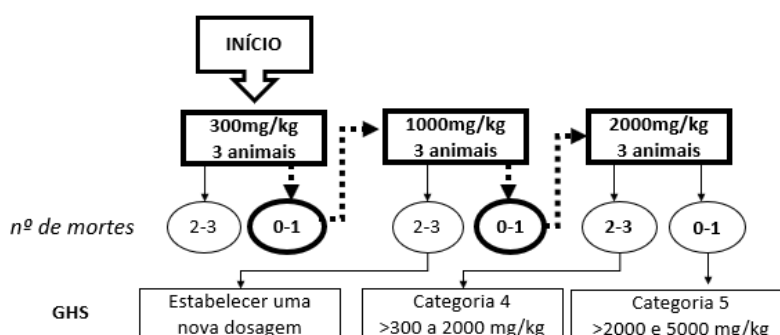
| Grupo | Tratamento |
|----------------|---|
| Controle (n=3) | Óleo de milho |
| B1 (n=3) | 300 mg biomassa ^{*1} /kg de peso corporal |
| B2 (n=3) | 1000 mg biomassa ¹ /kg de peso corporal |
| B3 (n=3) | 2000 mg biomassa ^{*1} /kg de peso corporal |

(*) Valores determinados segundo OECD 423 (2002). ¹ Óleo de milho como via de administração. Fonte: Elaborado pela autora

Após o período de adaptação de cinco dias, recebendo alimentação (Primor® MP 77) e água *ad libitum*, os animais foram divididos aleatoriamente e individualmente em gaiolas metabólicas para receber os tratamentos por gavagem, de uma só vez (dia 1), conforme o peso (Tabela 1). Os animais ficaram sob observação durante 14 dias em ambiente controlado com temperatura de 20 ± 2 °C e ciclo de luz de 12 horas.

Com base na recomendação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2015) para a inclusão de novos aditivos, foi adotada a metodologia 423 OECD (2002) para estimar a menor dosagem que cause mortalidade (classificação GHS). Iniciou-se o teste com a menor dosagem (300 mg/kg) no grupo B1, observou-se o comprometimento (ou não) dos animais por 12 horas e, então, aumentou-se a dosagem para os grupos B2 e B3 (1000 e 2000 mg/kg, respectivamente). Neste experimento, optamos por incluir uma dose intermediária, conforme o esquema apresentado na Figura 1, o que resultou em quatro tratamentos (Tabela 1), que foram repetidos por 3 vezes.

Figura 1 – Esquema adaptado da metodologia recomendado pela OECD (2002) para o ensaio de toxicidade aguda em dose única, a partir da dose de 300 mg/kg, empregando-se três animais de um único sexo por etapa. Fonte: adaptado da OECD (2002). Linhas pontilhadas indicam o fluxo da metodologia. 0,1,2,3 correspondem ao número de moribundos ou animais mortos em cada etapa. GHS: Sistema de Classificação Mundial Harmonizado (mg/kg de peso corporal).



Fonte: Elaborado pela autora

2.2.3 Observações fisiológicas e comportamentais

O peso dos animais, o consumo de água e de ração, a temperatura retal e a produção de excretas foram registrados diariamente. O comportamento dos animais, indicativo da atividade do sistema nervoso autônomo, foi monitorado por parâmetros

definidos como “*screening* hipocrático” (Figura 2) e as alterações foram classificadas por meio de escores (0 = ausência de sinais, 1 = raros sinais, 2 = poucos sinais, 3 = sinais moderados e 4 = sinais intensos) (BRITO, 1994).

Quadro 1 - Descrição das análises observacionais

| Observações gerais | Descrição dos sinais |
|--------------------|---|
| Atividade geral | Verificar atividade geral do animal na gaiola moradia após estímulo; entende-se, como atividade geral, dentre os outros comportamentos, a presença de locomoção, levantar, farejar e/ou parado. |
| Frêmito vocal | Observar se há emissão de som sem nenhum estímulo ou toque. |
| Irritabilidade | Assoprar e/ou tocar levemente para examinar a reação. |
| Resposta ao toque | Pegar, tocar num intervalo de tempo mais prolongado (mais de 15 segundos) e verificar respostas. |
| Contorção | Verificar se está presente ou não. |
| Trem posterior | Verificar se está com a postura normal ou caído (intensidade ou modo de andar). |
| Endireitamento | O animal é colocado sobre a mesa em decúbito dorsal; mede-se o tempo gasto para que volte à posição normal em até 30 segundos (decúbito ventral). |
| Força de agarrar | Colocar o animal em cima de uma grade e avaliar a intensidade que se segura na mesma. |
| Reflexo auricular | Estalar dos dedos uma vez e analisar reflexo. Logo após estalar várias vezes seguidas e observar reflexos. |
| Posição da cauda | Verificar se a cauda está caída ou ereta; se ereta, verificar intensidade. |
| Piloreção | Observar se os pelos estão eretos e sua intensidade. |

Fonte: CUNHA et al., 2009.

2.2.4 Eutanásia, necropsia, biometria e análise histopatológica

No 15º dia de experimento, os animais foram pesados, anestesiados com tiopental sódico, eutanasiados e necropsiados. Fígados e rins foram pesados para cálculo de massa relativa (CUNHA et al., 2009) e amostras foram fixadas em formol tamponado 10% pH 7,4 e processadas pela técnica de hematoxilina e eosina (HE).

2.2.5 Análise estatística

Os resultados do *screening* hipocrático foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para a comparação dos scores obtidos, uma vez que os dados não apresentaram normalidade e homogeneidade. Os demais parâmetros foram analisados por análise de variância (ANOVA) e teste de Dunnet para a comparação de médias. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SAS (Statistical Analysis System), versão 9.,3 para Windows, e o nível de significância adotado foi de 5%.

2.3 RESULTADOS

2.3.1 Observações comportamentais

Não foi observada alteração significativa no comportamento dos animais tratados (Tabela 2). Também não houve ocorrência de mortalidade em nenhum grupo em nenhuma das etapas do estudo.

Tabela 2 - Escores* obtidos na avaliação comportamental dos animais submetidos ao teste de toxicidade aguda com biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*

| Variável | Grupo | | | | | | | |
|-------------------|----------|-------------|----|-------------|----|-------------|----|-------------|
| | Controle | | B1 | | B2 | | B3 | |
| | Md | Min. – Máx. | Md | Min. – Máx. | Md | Min. – Máx. | Md | Min. – Máx. |
| Atividade Geral | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 |
| Frêmito vocal | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 - 0 |
| Irritabilidade | 3 | 2 – 3 | 3 | 3 – 3 | 3 | 2 – 3 | 3 | 2 – 4 |
| Resposta ao toque | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 |
| Contorção | 4 | 3 – 4 | 4 | 4 – 4 | 3 | 3 – 3 | 3 | 3 – 4 |
| Trem posterior | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 - 0 | 0 | 0 - 0 |
| Endireitamento | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 |
| Força de agarrar | 4 | 4 – 4 | 4 | 4 – 4 | 4 | 3 – 4 | 4 | 4 – 4 |
| Reflexo auricular | 4 | 3 – 4 | 4 | 4 – 4 | 3 | 3 – 4 | 4 | 3 – 4 |
| Posição da cauda | 3 | 3 – 3 | 3 | 2 – 4 | 3 | 2 – 3 | 2 | 2 – 4 |
| Piloereção | 1 | 0 – 1 | 1 | 0 – 2 | 1 | 0 – 2 | 1 | 1 – 1 |

Teste Kruskal-Wallis ($p < 0,05$). * 0 = ausência de sinais, 1 = raros sinais, 2 = poucos sinais, 3 = sinais moderados, 4 = sinais intensos. Md = mediana; Min. = mínimo; Máx. = máximo. Controle = óleo de milho; B1 = 300 mg biomassa/kg; B2 = 1000 mg biomassa/kg; B3 = 2000 mg biomassa/kg. Fonte: Elaborado pela autora

2.3.2 Avaliações fisiológicas

Dentre os dados gerais monitorados, o ganho de peso ponderal (%) diferiu do grupo controle e B1, enquanto que a produção de urina (ml) no grupo B2 diferiu dentre os tratamentos (Tabela 3).

Tabela 3 - Médias (n = 3) e desvios padrões dos dados fisiológicos de ratas submetidas ao teste de toxicidade aguda com biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*

| Variável | Grupo | | | |
|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|----------------------------|
| | Controle | B1 | B2 | B3 |
| Peso inicial (g) | 266 ± 0 ^{ab} | 240 ± 26,68 ^{ab} | 287 ± 19,61 ^a | 212 ± 19,8 ^{ab} |
| Peso final (g) | 285 ± 11 ^{ab} | 291 ± 29,32 ^{ab} | 315 ± 30,34 ^{ab} | 255 ± 17,46 ^{ab} |
| Ganho de peso ponderal (%) | 7,14 ± 4,13 ^a | 21,54 ± 1,93 ^b | 9,83 ± 7,94 ^{ab} | 20,77 ± 4,66 ^{ab} |
| Consumo de ração (g) | 26,66 ± 0,29 | 24,42 ± 1,50 | 24,34 ± 6,52 | 22,56 ± 2,99 |
| Consumo de água (ml) | 42,43 ± 0,86 | 44,19 ± 1,92 | 46,21 ± 6,10 | 36,1 ± 3,10 |
| Fezes (g) | 10,47 ± 0,28 | 10,24 ± 0,40 | 10,65 ± 3,45 | 8,55 ± 1,44 |
| Urina (ml) | 2,46 ± 0,74 ^{ab} | 4,63 ± 1,44 ^{ab} | 7,35 ± 0,62 ^c | 3,64 ± 1,70 ^{ab} |
| Temperatura (°C) | 35,1 ± 0,09 | 35 ± 0,29 | 34,9 ± 0,09 | 34,8 ± 0,51 |

Ganho de peso ponderal = (peso final – peso inicial) x 100. Médias seguidas de letras distintas, na linha diferem entre si pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). Controle = óleo de milho; B1 = 300 mg biomassa/kg; B2 = 1000 mg biomassa/kg; B3 = 2000 mg biomassa/kg. Fonte: Elaborado pela autora

2.3.3 Biometria e Histopatologia

Não foram observadas diferenças significativas nas características macroscópicas nem nos pesos absoluto e relativo dos fígados e rins dos animais tratados em comparação ao grupo controle (Tabela 4).

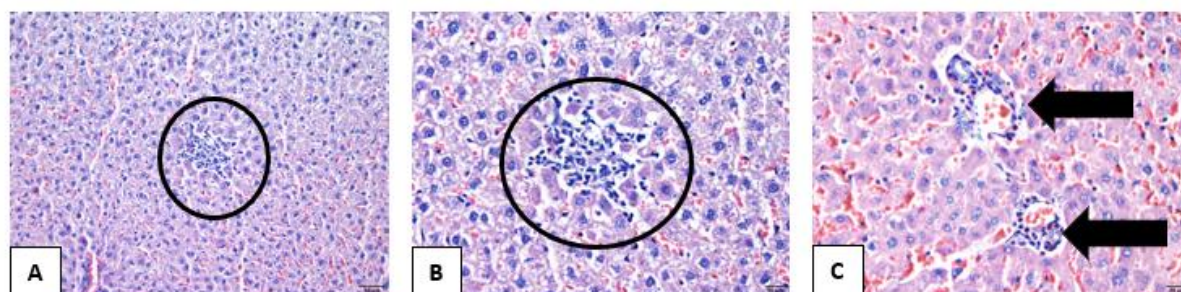
Tabela 4 - Médias (n = 3) e desvios padrões dos dados biométricos de fígados e rins de ratas submetidas ao teste de toxicidade aguda com biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*

| Variável | Grupo | | | | |
|----------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | Controle | B1 | B2 | B3 | |
| Fígado | Peso absoluto (g) | 13,90±1,86 ^a | 13,86±1,14 ^a | 13,47±2,14 ^a | 13,17±1,69 ^a |
| | Peso Relativo | 4,55±0,64 ^a | 4,90±0,35 ^a | 4,25±0,52 ^a | 5,26±0,44 ^a |
| Rim | Peso absoluto (g) | 2,37±0,34 ^a | 2,44±0,08 ^a | 2,83±0,19 ^a | 2,21±0,18 ^a |
| | Peso Relativo | 0,78±0,12 ^a | 0,87±0,09 ^a | 0,91±0,11 ^a | 0,88±0,02 ^a |

Peso relativo= (peso do órgão/peso final do animal) x 100. Controle = óleo de milho; B1 = 300 mg biomassa/kg; B2 = 1000 mg biomassa/kg; B3 = 2000 mg biomassa/kg. Fonte: Elaborado pela autora

A presença de infiltrado inflamatório mononuclear discreto no espaço porta foi um achado em todos os grupos, enquanto que apenas nos grupos tratados se verificou a ocorrência de degeneração e necrose de hepatócitos, nos grupos B1 e B2 também foi encontrada eosinofilia discreta. A Figura 2 ilustra os achados histopatológicos dos fígados dos animais submetidos aos tratamentos.

Figura 3 – Fotomicrografia de cortes histológicos dos fígados de ratas avaliadas no experimento: (A) Ponto focal de degeneração e necrose na objetiva de 20x (HE) com infiltrados inflamatórios no grupo B1 (300 mg biomassa/kg); (B) Objetiva 40x (HE) de ponto focal de degeneração e necrose com infiltrados inflamatórios no grupo B1 (300 mg biomassa/kg); (C) Infiltrado inflamatório mononuclear e eosinófilos no espaço porta no grupo B3 (2000 mg biomassa/kg) na objetiva 40x (HE).



Fonte: Elaborado pela autora

2.4 DISCUSSÃO

O protocolo estabelecido pela OECD 423 (2001) empregado neste estudo (Figura 1) permitiu classificar a biomassa de *Rubrivax gelatinosus* na Classe 5 de toxicidade, segundo o *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals* – GHS, ou seja, de baixa toxicidade aguda.

Alterações de peso corporal, consumo de alimentos e água e locomoção, bem como ocorrência de piloereção, diarreia e mortalidade são considerados sinais de toxicidade (BARBIERI et al., 2010). Estes aspectos, no entanto, não foram encontrados neste estudo. Ainda que diferenças de pesos tenham sido observadas entre os grupos Controle e B1, para Barbosa (2014), sinais de toxicidade são evidenciados quando há perda de peso atrelada a alterações no consumo de ração, o que não foi observado neste experimento. A mesma correlação pode ser feita quanto ao aumento significativo na produção de urina observado no grupo B2 que, segundo Rocha et al. (2012), teria relação com toxicidade sistêmica se houvesse uma consequente diminuição do peso dos animais.

Os resultados indicaram não comprometimento dos sistemas nervosos central e autônomo dos animais testados e ausência de óbito. Com base no GHS é possível estimar que as doses tóxicas de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* sejam superiores a 2000 mg/kg de peso corpóreo. Não foi possível o estabelecimento da menor dose que cause mortalidade, uma vez que não houve morte.

O fígado é o órgão responsável pelo processamento e armazenamento dos nutrientes absorvidos no trato digestivo (SMITH et al., 2018) e, assim, torna-se vulnerável a uma ampla variedade de agressões (REIS et al., 2017), que podem causar inflamação crônica e, conseqüentemente, a necrose dos hepatócitos (TOZZE et al., 2010). Por isso, a análise histopatológica desse órgão pode auxiliar na caracterização de lesões induzidas por compostos químicos. Um processo inflamatório no órgão pode ser identificado pelo tipo e pela distribuição de células mononucleares infiltradas e pela destruição e cicatrização teciduais (LALOR et al., 2002; TOZZE et al., 2010).

Os achados histopatológicos observados nos animais controles e nos animais que receberam a biomassa bacteriana foram inespecíficos e discretos. A presença de infiltrado inflamatório mononuclear no espaço porta geralmente é considerado um achado inespecífico, visto que animais saudáveis podem apresentar

este tipo de infiltrado e não estão definidos os fatores que predispõem a esse tipo de achado microscópico (LALOR, ADAMS, 1999; LALOR et al., 2002). As áreas de degeneração e necrose hepática observadas nos grupos experimentais foram discretas e aleatórias, não caracterizando lesão tóxica (HASCHEK et al., 2010), uma vez que a exposição do fígado a agentes xenobióticos pode resultar em respostas que geralmente não são considerados efeitos tóxicos, mas sim respostas e tentativas de se ajustar ao novo ambiente ou condições (HASCHEK et al., 2010). Também não foram evidenciados sinais de hepatotoxicidade, uma vez que lesões difusas como as encontradas na análise histopatológica são consideradas problemáticas quando há comprometimento de 75% do parênquima hepático e fibrose (SANTOS, 2008). No entanto, não é possível afirmar se o infiltrado no espaço porta é um achado de caráter fisiológico ou patológico, uma vez que ainda há muita incompreensão quanto aos fatores que determinam a infiltração hepática (LALOR, ADAMS, 1999; LALOR et al., 2002). Deste modo, todas as lesões encontradas podem ser consideradas espontâneas e incidentais por terem ocorrido simultaneamente, tanto em animais do grupo controle quanto nos animais que receberam a biomassa bacteriana.

A alteração da massa relativa de órgãos como fígados e rins também representa um sinal de toxicidade (Cunha et al., 2009), porém, no presente estudo, tanto o peso absoluto quanto o peso relativo desses órgãos apresentaram-se dentro da normalidade para a espécie.

2.5 CONCLUSÃO

A biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* foi considerada de baixa toxicidade e classificada na categoria 5 da *Globally Harmonized System of Classification and Labeling of Chemicals*, com DL50 > 2000 mg/kg peso corporal.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia de procedimentos para pedidos de inclusão e extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação na legislação brasileira.** 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Guia+de+Procedimentos+para+Pedidos+de+Inclus%C3%A3o+e+Extens%C3%A3o+de+Uso+de+Aditivos+Alimentares+e+Coadjuvantes+de+Tecnologia+de+Fabrica%C3%A7%C3%A3o+na+Legisla%C3%A7%C3%A3o+Brasileira.pdf/ad2f1a36-276c-4115-ba6b-62ccf3305400>>. Acesso em: 15 dez. 2016.
- ALMEIDA, L. P.; REIS, D. O.; KARRIJO, K. F. Abscessos hepáticos como causa de condenação em bovinos de abate. **Hig. Aliment.**, v.19, n.134, p.51-53, 2005.
- ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE PROTEÍNA ANIMAL - ABPA. **Mercado Mundial.** 2017. Disponível em: <http://abpa-br.com.br/storage/files/3678c_final_abpa_relatorio_anual_2016_portugues_web_reduzido.pdf>. Acesso em: 8 jan. 2018.
- AVANÇO, S. V.; PONSANO, E. H. G.; GARCIA-NETO, M.; PINTO, M. F. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* na criação de frangos de corte: desempenho animal e cor dos produtos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**, v.66, p.1831-1838, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7305>.
- BARBIERI, D. F.; WISNIEWSKI, E.; WISNIEWSKI, M. S. W.; ROMAN, S. S.; CHICOTA, L. C.; CEREZER, S. M.; DALLAGO, R. Animal toxicity caused by formaldehyde and complucad® in wistar rats: acute exposure. **Rev. Int. Est. Exp.**, v.2, n.4, p.114-119, 2010.
- BRITO A. S. **Manual de ensaios toxicológicos In Vivo.** Campinas: Unicamp, 1994. 122p.
- CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JÚNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v.9, n.2A, p.403-11, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2009000300012>.
- GERBENS-LEENES, P. W.; MEKONNEN, M. M.; HOEKSTRA, A. Y. The water footprint of poultry, pork and beef: a comparative study in different countries and production systems. **Water Res. Indust.**, p.25-36, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.wri.2013.03.001>
- HASCHEK, W. M.; WALLING, M. A.; ROUSSEAUX, C. **Fundamentals of Toxicology Pathology: the liver.** 2nd ed. San Diego: Califórnia. Elsevier, 2010.
- JEMLI, M.; KARRAY, F.; FEKI, F.; LOUKIL, S.; MHIRI, N.; ALOUI, F.; SAYADI, S. Biological treatment of fish processing wastewater: a case 2 study from Sfax City

(Southeastern Tunisia). **J. Environ. Sci.**, v.30, p.102-112, 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jes.2014.11.002>

LALOR, P. F.; SHIELDS, P.; GRANT, A. J.; ADAMS, D. H. Recruitment of lymphocytes to the human liver. **Immunol. Cell Biol.**, v.80, p.52-64, 2002. <https://doi.org/10.1046/j.1440-1711.2002.01062.x>

LALOR, P. F.; ADAMS, D. H. Adhesion of lymphocytes to hepatic endothelium. **Exp. Mol. Pathol.**, v.52, p.214-219, 1999. <http://dx.doi.org/10.1136/mp.52.4.214>

NAGASHIMA, S.; KAMIMURA, A.; SHIMIZU, T.; NAKAMURA-ISAKI, S.; AONO, E.; SAKAMOTO, K.; ICHIKAWA, N.; NAKAZAWA, H.; YAMAZAKI, S.; FUJITA, N.; SHIMADA, K.; HANADA, S.; NAGASHIMA, K. V. Complete genome sequence of phototrophic betaproteobacterium *Rubrivivax gelatinosus* IL144. **J. Bacteriol.**, v.194, n.13, p.3541-3542, 2012. <http://dx.doi.org/10.1128/JB.00511-12>

Organization for Economic Cooperation and Development: OECD Guideline for testing of chemicals. **Acute oral toxicity-acute toxic class method, guideline no. 423.** Rome 2001. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oecd/oecd_gl423.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2016.

PONSANO, E. H. G.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C. From a pollutant by product to a feed ingredient. In: MATOVIC, D. (Ed) **Biomass** – detection, production and usage. Rijeka: Intech, 2011. p.461-472. <http://dx.doi.org/10.5772/19092>

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M., PINTO, M. F. Chemical composition of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass produced in poultry slaughterhouse wastewater. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.46, p.143-147, 2003.

PONSANO, E. H. G.; LACAVA, P. M., PINTO, M. F. Isolation of *Rhodocyclus gelatinosus* from poultry slaughterhouse wastewater. **Braz. Arch. Biol. Technol.**, v.45, p.445-449, 2002. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7305>

PONSANO, E. H. G.; PAULINO, C. Z.; PINTO, M. F. Phototrophic growth of *Rubrivivax gelatinosus* in poultry slaughterhouse wastewater. **Bioresource Technol.**, v.99, p.3836-3842, 2008. <http://doi:10.1590/s1516-89132002000600007>

REIS, M. R.; DE PAIVA, M. H. P.; BARBOSA, O. N.; BARROS, E. M. L.; LUZ, R. F.; VIANA, V. G. F. Histological study of the acute effects of colloidal silver in organs of Wistar rats. **Rev. Enferm. UFPI.**, v.6, n.1, p.9-13, 2017. <http://doi:10.26694/reufpi.v6i1.5778>

ROCHA, A. O. B.; PITA, J. C. L. R.; OLIVEIRA, K. M. ; MOTA, C. A. X.; ESTEVAM, E. C.; VIANA, W. P.; SILVEIRA, R. C.; DINIZ, M. F. F. M. Toxicological effect of *Pradosia huberi* Ducke hydroalcoholic extract in the Wistar rats. **Rev. Bras. Farm.**, v.93, n.3, p.371-378, 2012.

SANTO, E. F. E.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E. H. G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax*

gelatinosus biomass. **Food Sci. Technol.**, v.33, n.1, p.47-51, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000008>

SANTOS, J. C. A.; RIET-CORREA, F.; SIMOES, S. V.D.; BARROS, C. S.L.. Patogênese, sinais clínicos e patologia das doenças causadas por plantas hepatotóxicas em ruminantes e eqüinos no Brasil. **Pesq. Vet. Bras.** [online]., vol.28, n.1, p.1-14, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-736X2008000100001&script=sci_abstract&tIng=pt>. Acesso em: 19 mar. 2019. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-736X2008000100001>.

SMITH, B.; HSU, Y-H.; FLORES, R.; GAGEA, M.; CRAIG, S.; HUNG, M-C. Single oral dose acute and subacute toxicity of a c-MET tyrosine kinase inhibitor and CDK 4/6 inhibitor combination drug therapy. **Am. J. Cancer Res.**, v.8, n.1, p.183-191, 2018.

TOZZE, R. E. R.; MONTEBELLO, G. F.; PAGELKOPF, V. C. **Resumo - Inflamação crônica, inflamação granulomatosa e reparação tecidual.** Disponível em: <<http://disciplinas.famerp.br/Patologia/Documentos%20%20Inflamao%20crnica%20inflamao%20granulomatosa/Resumo%20%20Inflama%C3%A7%C3%A3o%20cr%C3%B4nica.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

YUN, J.-W.; YOU, J.-R.; KIM, Y.-S.; KIM, S.-H.; CHO, E.-Y.; YOON, J.-H.; KWON, E.; JANG, J.-J.; PARK, J.-S.; KIM, H.-C.; CHE, J.-H.; KANG, B.-C. In vitro and in vivo safety studies of cinnamon extract (*Cinnamomum cassia*) on general and genetic toxicology. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v.95, p.115-123, 2018. <http://dx.doi.org/10.1016/j.yrtph.2018.02.017>.

ZATTA, D. T.; PIMENTA, F. C.; TRESVENZOL, L. M. F.; FIUZA, T. S.; BARA, M. T.; CUNHA, L. C.; PUCCI, L. L.; GARROTE, C. F. D.; OLIVEIRA, F. N. M.; PAULA, J. R. Estudo da Atividade Antibacteriana contra cepas de *Pseudomonas aeruginosa* e da Toxicidade Aguda das folhas da Jacaranda decurrens. **Lat. Am. J. Pharm.**, v.28, p.485-489, 2009.

CAPÍTULO 3 – TOXICIDADE SUBAGUDA ORAL POR DOSAGEM REPETIDA DA BIOMASSA DE *Rubrivivax gelatinosus*

RESUMO

Qualquer aditivo para uso alimentar deve passar por testes que comprovem baixo risco ao consumidor. A biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, com propriedades pigmentantes e antioxidantes, apresenta potencial para aplicação industrial e, para tanto, necessita ter sua inocuidade atestada. Já tendo sido classificada como de baixa toxicidade aguda, o objetivo deste trabalho foi avaliar sua toxicidade subaguda (dosagem repetida). Ratas da linhagem Wistar com idade de oito semanas foram divididas aleatoriamente em quatro grupos e receberam, durante 14 dias, dosagens repetidas via gavagem dos seguintes tratamentos: controle (óleo de milho), R1 (50 mg de biomassa/kg de peso corpóreo), R2 (100 mg de biomassa/kg de peso corpóreo), R3 (300 mg de biomassa/kg peso corpóreo) e SAT (300 mg de biomassa/kg peso corpóreo + 14 dias) sendo o óleo de milho a via de administração da biomassa. O grupo SAT foi utilizado para a avaliação do caráter persistente de efeito durante 14 dias após a aplicação dos tratamentos. As doses foram determinadas anteriormente em teste de toxicidade aguda (dosagem única). Parâmetros fisiológicos (peso, consumo de ração e água, produção de excretas e temperatura) e parâmetros comportamentais (*screening* hipocrático) foram avaliados durante a aplicação dos tratamentos. Ao final do experimento, os animais foram anestesiados e, após a colheita de sangue para análises bioquímicas e hematológicas, foram eutanasiados. Fígados e rins foram submetidos a análises histopatológicas. Os parâmetros fisiológicos foram avaliados por ANOVA seguida pelo teste de Dunnet para as comparações entre os grupos e os resultados com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Os resultados do *screening* hipocrático foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para a comparação dos escores médios. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos em relação aos parâmetros fisiológicos e, na observação comportamental, somente a piloereção foi significativamente notada com relação ao controle. A contagem de hemácias (RBC) mostrou-se significativamente maior no grupo R2 em relação ao controle e os parâmetros bioquímicos de todos os animais mantiveram-se dentro da normalidade para a espécie estudada. Não foram encontradas alterações características de

toxicidade nos ensaios histopatológicos. Como não foram encontrados sinais de toxicidade subaguda ou óbitos decorrentes da aplicação da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, o produto não encontrou categorização no Sistema de Classificação Mundial Harmonizado.

PALAVRAS-CHAVE: Aditivo alimentar. Corante natural. Antioxidante natural.

Toxicologia.

CHAPTER 3 - ORAL SUBACUTE TOXICITY OF THE BIOMASS OF *Rubrivivax gelatinosus* BY REPEATED DOSAGE

ABSTRACT

Any food additive must go through tests to prove low risk to the consumer. The biomass of *Rubrivivax gelatinosus*, with pigment and antioxidant properties, presents potential for industrial application and, for that, needs to have its innocuity attested. Already classified as low acute toxicity, the objective of this study was to evaluate its subacute toxicity (repeated dosage). Wistar female rats aged 8 weeks were randomly divided into four groups and received, for 14 days, repeated dosages via gavage of the following treatments: control (corn oil), R1 (50 mg of biomass / kg of body weight), R2 (100 mg biomass / kg body weight), R3 (300 mg biomass / kg body weight) and SAT (300 mg biomass / kg body weight + 14 days), corn oil being the route of administration of the biomass. The SAT group was used to evaluate the persistence of the effect for 14 days after the application of the treatments. Doses were previously determined on an acute toxicity test (single dose). Physiological parameters (weight, feed and water consumption, excreta production and temperature) and behavioral parameters (Hippocratic screening) were evaluated during the application of treatments. At the end of the experiment, the animals were anesthetized and, after blood sampling for biochemical and hematological analyzes, were euthanized. Livers and kidneys were submitted to histopathological analysis. The physiological parameters were evaluated by ANOVA followed by the Dunnet test for the comparisons between the groups and the results with $p < 0.05$ were considered statistically significant. The results of the hippocratic screening were submitted to the Kruskal-Wallis test to compare the average scores. No significant differences were found between the groups in relation to the physiological parameters and, in the observation of the behavioral ones, only the piloerection was significantly noticed in relation to the control. The red blood cells (RBC) count was significantly higher in the R2 group than in the control group and the biochemical parameters of all the animals remained within the normal range for the species studied. No characteristic changes of toxicity were found in histopathological studies. As there were no signs of subacute toxicity or death resulting from the application of the *Rubrivivax gelatinosus* biomass, the product did not find categorization in the Harmonized World Classification System.

KEYWORDS: Food additives. Food coloring. Antioxidant. Toxicology.

3.1 INTRODUÇÃO²

Embora a utilização de aditivos na industrialização de alimentos traga benefícios tecnológicos, há uma frequente preocupação quanto aos riscos relacionados ao seu consumo, trazendo um conflito entre a necessidade e a segurança de seu uso (BRASIL, 1997). O desconforto de parte da população em consumir alimentos industrializados cuja produção envolva o emprego de aditivos sintéticos reforça o mercado potencial dos aditivos alimentícios de origem natural (DEL RÉ; JORGE, 2012).

Considerando que um aditivo alimentar não pode trazer perigo ao consumidor, a investigação acerca da toxicidade de uma potencial substância com essa finalidade é imperativa quando se visa o consumo por humanos (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2015).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) sugere que a investigação da toxicidade de um aditivo potencial se inicie com a avaliação dos efeitos agudos e seja seguida pela avaliação dos efeitos sistêmicos ou subagudos, com base na administração oral repetida da substância de interesse durante um período limitado (ANVISA, 2015). Para a avaliação da toxicidade subaguda, o composto teste deve ser administrado por gavagem, por meio da dieta ou de água potável durante 28 dias e o relatório do estudo deve incluir resultados de observações funcionais, peso corporal e medidas de consumo de alimentos/água, hematologia e bioquímica, além de necropsia e estudo histopatológico (OECD 407, 2008).

A biomassa da bactéria fototrófica *Rubrivivax gelatinosus* apresenta potencial de uso como aditivo alimentar devido às suas propriedades pigmentantes e antioxidantes (AVANÇO et al., 2014; GRASSI et al., 2016). Após ter sido classificada como de baixa toxicidade aguda, é necessário conhecer os efeitos tóxicos da exposição contínua à biomassa, o que constitui o objetivo deste trabalho.

² Este artigo será submetido à publicação no Food and Chemical Toxicology (Journal).

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Produção da biomassa

O efluente de indústria de processamento de tilápia (Royal fish. Buritama/SP) foi utilizado como substrato para a produção da biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*. Após a pasteurização do efluente, a bactéria foi inoculada (7 dias a $30 \pm 5^\circ\text{C}$, luminosidade de 2000 ± 500 lux) e cultivada, seguindo o protocolo de Ponsano et al. (2011). Para ser transformado na biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*, o cultivo foi filtrado, centrifugado e desidratado de acordo com procedimentos descritos por Santo et al. (2013). Foi obtido um pó de coloração avermelhada conforme caracterizado por Ponsano et al. (2003).

3.2.2 Animais

Os animais utilizados neste estudo foram provenientes do biotério da Faculdade de Odontologia de Araçatuba da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Quinze ratas da linhagem *Wistar* com aproximadamente 8 semanas de idade foram alojadas individualmente em gaiolas metabólicas no biotério da Faculdade de Medicina Veterinária de Araçatuba. Durante todo o experimento, o ambiente foi controlado com temperatura de $20 \pm 2^\circ\text{C}$ e ciclos de luz de 12 h. Os animais receberam alimentação (Primor® MP 77) e água *ad libitum* e, após um período de adaptação de cinco dias, foram divididos aleatoriamente para receber os diferentes tratamentos. O experimento foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA/FOA nº 00218-2017) (ANEXO A).

3.2.3 Tratamentos e delineamento experimental

O experimento utilizou um delineamento inteiramente casualizado, com cinco tratamentos e três repetições (três animais). As concentrações de biomassa que compuseram os tratamentos (Tabela 1) foram definidas a partir de dados obtidos no ensaio agudo prévio e também foram descritas por Cunha et al. (2009). A biomassa foi administrada diariamente via gavagem durante 14 dias, em óleo de milho como

veículo. O grupo SAT foi tratado com a dose mais alta da biomassa durante 14 dias adicionais e, em seguida, foi feita a suspensão do tratamento (14 dias) para avaliar o caráter reversivo ou a persistência de efeitos tóxicos.

Tabela 1 - Delineamento experimental do estudo de toxicidade subaguda com doses repetidas de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*

| GRUPO | TRATAMENTO |
|----------------|--------------------------------------|
| CONTROLE (n=3) | Óleo de milho |
| R1 (n=3) | 50 mg biomassa /kg de peso corporal |
| R2 (n=3) | 100 mg biomassa /kg de peso corporal |
| R3 (n=3) | 300 mg biomassa /kg de peso corporal |
| SAT (n=3) | 300 mg biomassa/kg de peso corporal |

Fonte: Elaborado pela autora

3.2.4 Registro de parâmetros fisiológicos e comportamentais

Diariamente foram tomados dados a respeito da temperatura retal, do consumo de água e ração e da produção de excretas. Alterações comportamentais das ratas foram monitoradas e classificadas por meio de escores (0 = ausência de sinal, 1 = raros sinais, 2 = poucos sinais, 3 = sinais moderados e 4 = sinais intensos) seguindo um *screening* hipocrático (BRITO, 1994).

3.2.5 Eutanásia, necropsia e análise histopatológica

Ao final de 15 dias, com exceção do grupo SAT, os animais foram pesados e anestesiados com tiopental sódico. A colheita de sangue foi feita por punção da veia da cauda e, em seguida, os animais foram eutanasiados e necropsiados. Fígados e rins foram pesados, fixados em formol tamponado 10% pH 7,4 e submetidos a análise histopatológicas em cortes corados com hematoxilina e eosina (HE). Os mesmos procedimentos foram utilizados com o grupo SAT, 28 dias após o início do tratamento.

3.2.6 Análises hematológicas e bioquímicas

Os hemogramas foram realizados em contador automatizado de células (BC-2800Vet, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co, Nanshan, China) e incluíram contagem de células brancas (WBC), contagem de células vermelhas (RBC), concentração de hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM), concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) e contagem de plaquetas (PLT). A contagem diferencial de leucócitos foi realizada em esfregaços sanguíneos corados com corante hematológico panótico rápido comercial (Instant-Prov, Newprov, Pinhais-PR).

As análises bioquímicas plasmáticas foram realizadas em espectrofotômetro automatizado (BS 200, Shenzhen Mindray Bio-Medical Electronics Co, Nanshan, China) previamente calibrado com calibrador e soros controles níveis I e II, utilizando reagentes comerciais (Biosystems, Barcelona, Spain). Foram mensuradas as concentrações plasmáticas de bilirrubina total (BT) (método de Jendrassik Grof, Dialab®), ureia (método enzimático UV urease/glutamato desidrogenase), creatinina (método cinético do picrato alcalino), proteína plasmática total (método do biureto), ácido úrico (método enzimático uricase/peroxidase); aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) (método cinético IFCC) e triglicerídeos (glicerol fosfato oxidase/peroxidase). Todas as reações bioquímicas foram processadas a 37 °C, conforme orientações dos fabricantes. As análises foram realizadas no laboratório de Análises Clínicas Veterinárias da Faculdade de Medicina Veterinária da Unesp, Campus de Araçatuba.

3.2.7 Análise estatística

Os resultados do *screening hipocrático* foram submetidos ao teste de Kruskal-Wallis para comparação dos escores médios, uma vez que os dados não apresentaram normalidade e homogeneidade. Os resultados dos pesos relativos dos órgãos e das análises séricas foram analisados por análise de variância e teste de Dunnet para a comparação entre as médias. As análises estatísticas foram realizadas com o programa SAS (Statistical Analysis System), versão 9.3 para Windows, com nível de significância de 5%.

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Parâmetros fisiológicos e comportamentais

Não foram observadas diferenças significativas entre o ganho de peso dos animais durante a aplicação dos tratamentos (Tabela 2). Também não foram diferentes significativamente os valores encontrados para consumo de ração e água e temperatura retal dos animais.

Tabela 2 - Ganho de peso de ratas submetidas aos tratamentos experimentais com biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*. Médias (n=3) e desvios padrões.

| | Peso corpóreo (g) | | Ganho de peso ponderal (%) |
|----------------|-------------------|-------------|----------------------------|
| | Inicial | Final | |
| C | 245 ± 39,31 | 305 ± 3,06 | 26,87±22,63 |
| R1 | 235 ± 61,62 | 286 ± 38,57 | 25,35±20,04 |
| R2 | 249 ± 23,18 | 292 ± 7,21 | 18,11±11,44 |
| R3 | 260 ± 9,17 | 290 ± 10,39 | 11,54 ± 1,30 |
| SAT | 272 ± 17,09 | 313 ± 22,48 | 15,16 ± 1,27 |
| P-valor | 0,7431 | 0,4894 | 0,6600 |

Ganho de peso ponderal = (Peso final – peso inicial) x 100. C = óleo de milho; R1 = 50 mg de biomassa/kg de peso corporal; R2 = 100 mg de biomassa /kg de peso corporal, R3 = 300 mg de biomassa /kg de peso corporal e SAT = 300 mg de biomassa /kg de peso corporal por 14 dias adicionais. Fonte: Elaborado pela autora

Com exceção da ocorrência de sinais raros (escore 1) de piloereção nos animais dos grupos que receberam a biomassa, não foram observadas outras alterações comportamentais nos animais durante o experimento.

3.3.2 Parâmetros hematológicos e bioquímicos

Somente a contagem de hemácias (RBC) aumentou significativamente no grupo R2 em relação ao grupo controle. Os resultados do hemograma estão apresentados na Tabela 3, acompanhados de valores de referência.

Tabela 3 – Parâmetros hematológicos de ratas Wistar submetidas aos tratamentos experimentais com biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*. Médias (n=3) e desvios-padrões.

| Variável | Valores de referência | Grupos | | | | | P-valor |
|------------------------------|-----------------------|----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| | | C | R1 | R2 | R3 | SAT | |
| WBC (10 ³ /μl) | 3 – 17 | 7,53 ± 4,58 | 9,27 ±2,55 | 7,13 ± 2,06 | 7,70 ±1,74 | 10,33 ±3,39 | 0,6755 |
| RBC (10 ³ /mm) | 5 – 10 | 6,57 ±1,03 ^b | 7,64 ±0,27 ^{ab} | 8,29 ± 0,33 ^a | 7,79 ±0,30 ^{ab} | 7,84 ±0,62 ^{ab} | 0,0467 |
| HGB (g/dl) | 11 – 19 | 12,20 ±2,31 | 14,40 ±0,46 | 14,90 ±0,20 | 15,10 ±0,95 | 15,13 ±0,94 | 0,0667 |
| VCM (μ ³) | 46 – 65 | 56,40 ±2,31 | 56,40 ±0,75 | 56,53 ±1,63 | 59,01 ±2,01 | 56,27 ±1,42 | 0,2995 |
| CHCM (g/dl) | 31 – 40 | 32,83 ±0,85 | 33,43 ±0,96 | 27,40 ±8,26 | 32,80 ±0,35 | 24,70 ±9,02 | 0,2630 |
| PLT (10 ³ /μl) | 200 – 1500 | 1078,67 ±108,56 | 998 ±21,70 | 993,33 ±146,58 | 1018 ±41,77 | 952 ±107,76 | 0,5468 |

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). Valores de referências: SHARP; VILLANO, 2012. Contagem de células brancas (WBC), contagem de células vermelhas (RBC), concentração de hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (VCM), concentração média de hemoglobina corpuscular (CHCM) e contagem de plaquetas (PLT). C = óleo de milho; R1 = 50 mg biomassa/kg de peso corporal; R2 = 100 mg biomassa /kg de peso corporal, R3 = 300 mg biomassa /kg de peso corporal e SAT = 300 mg biomassa /kg de peso corporal por 14 dias adicionais. Fonte: Elaborado pela autora

Na Tabela 4 estão apresentados os valores dos parâmetros bioquímicos de referência e os obtidos no teste de toxicidade subaguda. Alterações nos parâmetros ácido úrico, ALT, AST, e BT foram notadas quando comparadas com valores de referência, entretanto não diferiram estatisticamente entre os tratamentos. A concentração de ureia foi superior nos animais do grupo SAT, diferindo estatisticamente somente do grupo R3, enquanto que na concentração de GGT, o grupo controle apresentou uma maior concentração, e diferiu estatisticamente dos grupos R3 e SAT.

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos obtidos dos sangues de ratas Wistar submetidas aos tratamentos experimentais com biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*. Médias (n=3) e desvios-padrões.

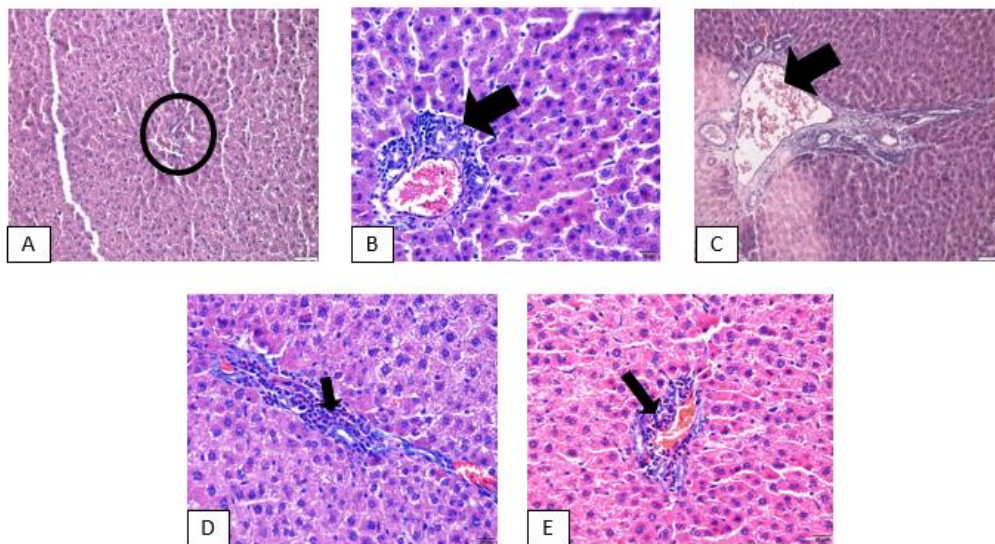
| Variável | Valores de referência | Grupos | | | | | P-valor |
|-------------------------|-----------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|-----------------------------|---------|
| | | C | R1 | R2 | R3 | SAT | |
| Ácido úrico (mg/dL) | 1,5 - 2,5* | 2,29 ±1,03 | 1,56 ±0,24 | 1,62 ± 0,63 | 1,56 ± 0,50 | 0,97 ± 0,19 | 0,4517 |
| ALT (U/L) | 25 – 60* | 101,54 ±18,45 | 81,34 ±13,06 | 102,16 ±11,84 | 89,82 ±24,31 | 77,03 ±15,04 | 0,2410 |
| AST (U/L) | 83 – 184* | 358,52 ±48,37 | 317,22 ±53,59 | 409,07 ±21,36 | 327,87 ±126,88 | 246,43 ±116,73 | 0,1900 |
| BT (mg/dL) | 0,07 – 0,09* | 0,11 ±0,05 | 0,13 ±0,06 | 0,13 ±0,03 | 0,11 ±0,01 | 0,11 ±0,02 | 0,8821 |
| Creatinina (mg/dL) | 0,4 – 0,7* | 0,59 ±0,03 | 0,58 ±0,01 | 0,61 ± 0,04 | 0,55 ± 0,01 | 0,55 ± 0,06 | 0,2615 |
| Proteínas totais (g/dL) | 6,1 – 7,4* | 6,66 ±0,28 | 6,37 ±0,09 | 6,68 ±0,27 | 6,14 ±0,09 | 6,72 ±0,31 | 0,0551 |
| Triglicérides (mg/dL) | 39 – 130* | 43,66 ±10,48 | 27,14 ±5,19 | 32,45 ±12,05 | 27,43 ±16,53 | 45,72 ±7,98 | 0,1855 |
| Ureia (mg/dL) | 51 - 61* | 45,49 ±0,97 ^{ab} | 52,59 ±3,27 ^{ab} | 46,03 ±7,71 ^{ab} | 40,30 ±7,03 ^b | 57,22 ±7,61 ^a | 0,0432 |
| GGT (U/L) | 3 - 6** | 6,92 ±4,23 ^a | 3,10 ±1,70 ^{ab} | 2,19 ±0,69 ^{ab} | 1,13 ± 0,86 ^b | 1,22 ± 0,87 ^b | 0,0401 |

Médias seguidas de letras distintas, na linha, diferem entre si pelo teste de Dunnet ($p < 0,05$). Valores de referência: *MELO et al., 2012; ** QUARESMA et al. 2007,. ALT = alanina aminotransferase; AST= aspartato aminotrasferase; BT= bilirrubinas totais; GGT = gamaglutamiltransferase. C = óleo de milho; R1 = 50 mg biomassa/kg de peso corporal; R2 = 100 mg biomassa /kg de peso corporal, R3 = 300 mg biomassa /kg de peso corporal e SAT = 300 mg biomassa /kg de peso corporal por 14 dias adicionais. Fonte: Elaborado pela autora

3.3.3 Análises Histopatológicas

No exame microscópico dos tecidos dos rins nenhuma alteração foi observada. Nos fígados, foi observado infiltrado inflamatório mononuclear em pelo menos um animal por grupo tratado, inclusive no grupo controle. Em um animal do grupo R3 foi observado espaço porta com infiltrado inflamatório polimorfonuclear e, em um animal do grupo SAT, foi encontrado infiltrado inflamatório moderado e multifocal com presença de eosinófilos. A Figura 1 ilustra os achados histopatológicos dos fígados dos animais submetidos aos tratamentos.

Figura 1 – Fotomicrografia de cortes histológicos dos fígados de ratas tratadas no estudo: (A) Grupo Controle na objetiva 10x (HE) com ponto focal de infiltrado inflamatório mononuclear discreto no espaço porta; (B) Grupo R2 com espaço porta infiltrado inflamatório mononuclear discreto na objetiva 40x (HE); (C) Grupo R3 com infiltrado inflamatório polimorfo nuclear no espaço porta na objetiva 40x (HE); (D) e (E) Grupo SAT infiltrado inflamatório misto (eosinófilo e neutrófilo) moderado e multifocal no espaço porta na objetiva 40x (HE). Controle = óleo de milho; R1 = 50 mg biomassa/kg de peso corporal; R2 = 100 mg biomassa/kg de peso corporal; R3 = 300 mg biomassa/kg de peso corporal e SAT = 300 mg biomassa/kg de peso corporal por 14 dias adicionais.



Fonte: Elaborado pela autora

3.4 DISCUSSÃO

A ausência de alterações nas avaliações comportamentais, hematológicas, bioquímicas e histológicas, apontaram para a inexistência de toxicidade subaguda decorrente da ingestão de biomassa de *Rubrivivax gelatinosus*.

As concentrações de ALT e AST não diferiram entre os grupos experimentais, mas estiveram acima dos valores de referência (MELO et al., 2012). Considerando que os animais tratados com a biomassa apresentaram concentrações de transaminases semelhantes à do grupo C, pode-se inferir que os valores encontrados são próprios da linhagem estudada. Dantas et al. (2006) e Melo et al. (2012) determinaram parâmetros fisiológicos para ratos e ratas Wistar em condições normais e identificaram variações significativas em função de fatores como idade, dieta, manuseio e ambiente, demonstrando a ocorrência de variações intraespécies. Haschek et al. (2010) acrescenta que espécies podem ter respostas diferentes ou, pelo menos, desiguais quando expostas a um agente potencialmente tóxico. A mesma conclusão se pode tirar para BT, uma vez que, embora acima dos valores de referência, todos os grupos apresentaram concentrações semelhantes. Sugestivamente, Dantas et al. (2006) consideram que cada biotério estabeleça seu conjunto de valores de referência dos animais normais, de acordo com a dieta, linhagem, sexo e idade.

Grande parte da ALT encontra-se nos hepatócitos e, por isso, sua pesquisa é utilizada para detectar, especificamente, danos hepáticos. Já a AST, considerada uma enzima de fase aguda, pode ser encontrada além de no fígado, nas musculaturas esqueléticas estriada e cardíaca, nos rins e nos eritrócitos e, portanto, não é indicativa de dano em local específico (GONZALEZ; SILVA, 2006; NELSON; COX, 2014). A elevação nas transaminases está relacionada com doenças como câncer de fígado, cirrose e hepatites virais, isquêmicas e medicamentosas (GONZALEZ; SILVA, 2006).

Os sinais de toxicidade sistêmica podem ser caracterizados por alterações de comportamento (FEDERATION FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS, 2014). A piloereção é considerada uma reação fisiológica do sistema nervoso autônomo simpático associada a situações de desconforto. Em roedores, a piloereção pode ser um sinal clínico de dor que pode ser classificado quanto à intensidade e vem comumente acompanhada de outros sinais, como

desidratação, em casos de desconforto ou dor intensos; porém esses sinais não foram observados nos animais durante o estudo (BENEDEK et al., 2010; FEDERATION FOR LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS, 2014). Considerando que a ocorrência de piloereção foi pouco intensa (SANTOS, 2013), pode-se inferir que os animais manifestaram desconforto, mas não dor durante o experimento, o que pode estar relacionado ao manejo (manuseio, contenção e gavagem) a que os animais eram submetidos durante o estudo.

Andrade et al. (2002) consideram, além da piloereção, o consumo de água e ração e o peso corporal como parâmetros úteis para indicar toxicidade causada pela administração contínua de substâncias químicas. Neste ensaio, não houve significância no ganho de peso nem no consumo de ração e água, o que novamente remete a piloereção ao manejo a que os animais estiveram submetidos.

Alterações nos parâmetros hematológicos e bioquímicos também podem indicar efeitos tóxicos (SHARP; VILLANO, 2012). O aumento na contagem de hemácias (RBC), apesar de significativo no grupo R2, mostrou-se dentro dos parâmetros pré-estabelecidos para ratas Wistar por Sharp; Villano (2012), o que não demonstra efeito de toxicidade nos animais. As enzimas ALT, AST, GGT e as BT são pesquisadas em exames bioquímicos de rastreio com a finalidade de identificar alterações ou doenças no fígado e/ou nas vias biliares (hepatograma). Em ensaios de toxicidade, a pesquisa desses parâmetros é efetuada para acompanhar a função hepática e, assim, detectar hepatotoxicidade (NELSON; COX, 2014).

A GGT é uma enzima menos específica do que as transaminases e, de modo geral, se eleva quando da ocorrência de lesões nas vias biliares e no fígado (GONZALEZ; SILVA, 2006). Neste estudo não foram encontradas diferenças significativas para as concentrações de GGT entre os grupos que receberam biomassa entretanto houve diferença significativa entre o grupo controle e os de maior concentração (R3 e SAT: 300 mg/kg). Além disso, as concentrações da enzima nesses grupos estiveram abaixo dos valores relatados como sendo de referência (QUARESMA et al., 2007). Estes resultados, aliados à ausência de necrose hepatocelular nas análises histopatológicas, permitem concluir que a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* não provoca alterações hepáticas. A lesão tóxica ao sistema hepático é uma resposta relativamente frequente quando os animais são expostos a xenobióticos. No entanto, a diversidade das respostas são extensas e mais sugestivas quando atreladas a investigação bioquímica (HASCHEK et al., 2010). Os infiltrados

inamatórios mononucleares encontrados nas análises histopatológicas apareceram distribuídos de forma aleatória (controle e tratados), não sendo considerados significativos, pois não é possível afirmar se são de caráter fisiológico ou patológico (LALOR; ADAMS, 1999; LALOR, 2002).

A dosagem de proteínas totais no plasma fornece um bom parâmetro para a avaliação do estado nutricional e de doenças renais (THRALL, 2007). O aumento pode significar doenças inflamatórias crônicas como cirrose, doenças bacterianas subagudas ou crônicas. A diminuição pode estar relacionada com perda excessiva de proteína, podendo ser por via renal (nefropatia), via intestinal (enteropatia), hemorragia ou, ainda, pela diminuição na síntese por insuficiência hepática. No presente estudo, os níveis de proteínas totais apresentaram-se dentro dos valores de referência (MELO et al., 2012) e estiveram em concordância com os resultados da análise histopatológica, em que não foram encontradas alterações significativas em rins e fígados.

A insuficiência renal está relacionada com falhas na excreção de ureia, creatinina e ácido úrico (THRALL, 2007). Neste estudo, apenas o grupo SAT apresentou um aumento na concentração de ureia, embora ainda dentro dos valores de referência (MELO et al., 2012). Os níveis plasmáticos de creatinina e ácido úrico não apresentaram alterações significantes entre os tratamentos e estiveram dentro dos valores de referência (MELO et al., 2012). A creatinina é mais indicada para verificar a função renal, uma vez que sua quantidade nos rins é mais constante (STEVEN; SCOTT, 2002). A análise histopatológica dos rins também não demonstrou alterações, permitindo concluir que a biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* não provocou sobrecarga renal nos animais.

A determinação de triglicerídeos é utilizada como indicativa de doença hepática ou biliar, síndrome nefrótica ou diabetes mellitus, podendo também se elevar com o uso de determinadas substâncias químicas. Neste estudo, com exceção do grupo SAT, os valores de triglicerídeos estiveram abaixo dos valores de referência. Em estudo toxicológico de óleo extraído de *Attalea phalerata Mart ex Spreng*, os autores observaram um comportamento similar aos achados neste estudo e atribuíram ao potencial hipolipidêmico dos carotenoides presentes na planta. É provável que o mesmo efeito tenha sido causado pelos carotenoides presentes na biomassa de *R. gelatinosus* testada neste experimento e, além disso, sugere-se um

efeito dose-dependente do produto, uma vez que o grupo SAT apresentou concentrações de triglicérides acima dos valores de referência (LIMA et al., 2017).

3.5 CONCLUSÃO

A biomassa da *Rubrivivax gelatinosus* não apresentou evidências de toxicidade subaguda em ratas nas avaliações comportamentais, hematológicas, bioquímicas e histológicas.

REFERÊNCIAS

- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA - ANVISA. **Guia de procedimentos para pedidos de inclusão e extensão de uso de aditivos alimentares e coadjuvantes de tecnologia de fabricação na legislação brasileira.** 2015. Disponível em: <<http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/389979/Guia+de+Procedimentos+para+Pedidos+de+Inclus%C3%A3o+e+Extens%C3%A3o+de+Uso+de+Aditivos+Alimentares+e+Coadjuvantes+de+Tecnologia+de+Fabrica%C3%A7%C3%A3o+na+Legisla%C3%A7%C3%A3o+Brasileira.pdf/ad2f1a36-276c-4115-ba6b-62ccf3305400>>. Acesso em: 15 dez. 2016.
- ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S. **Animais de Laboratório: criação e experimentação.** Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2002. 388 p.
- AVANÇO, S. V.; PONSANO, E. H. G.; GARCIA-NETO, M.; PINTO, M. F. Biomassa de *Rubrivivax gelatinosus* na criação de frangos de corte: desempenho animal e cor dos produtos. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.** v.66, p.1831-1838, 2014. <http://dx.doi.org/10.1590/1678-7305>.
- BARROS, C. S. L. Fígado, Vias Biliares e Pâncreas Exócrinos. In.: SANTOS, R. L.; ALESSI, A. C. **Patologia Veterinária.** São Paulo: Rocca, 2011. p.183-290.
- BENEDEK, M.; WILFLING, B.; LUKAS-WOLFBAUER, R.; KATZUR, B. H.; KAERNBACH, C. Objective and continuous measurement of piloerection. **Int. J. Psychophysiol.**, v.47, n.1, p.983-993, 2010. <http://dx.doi.org/10.1111/j.1469-8986.2010.01003.x>
- BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Legislação. Portaria nº 540, de 27 de outubro de 1997. Aprova o Regulamento Técnico: Aditivos Alimentares - definições, classificações e emprego. **Diário Oficial da União.** Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33916/391619/PORTARIA_540_1997.pdf/3c55fd22-d503-4570-a98b-30e63d85bdad>. Acesso em: 9 jan. 2017.
- BRITO A. S. **Manual de ensaios toxicológicos In Vivo.** Campinas: Unicamp, 1994. p.122.
- CASTELLO BRANCO, A. C. S.; DINIZ, M. F. F. M.; ALMEIDA, R. N.; SANTOS, H. B.; OLIVEIRA, K. M.; RAMALHO, J. A.; DANTAS, J. G. Biochemical and Hematological Parameters of Wistar Rats and Swiss Mice in the Professor Thomas George Animal Laboratory. **Rev. Bras. Ciênc. Saúde.**, v.15, n.2, p.209-214, 2011. <http://dx.doi.org/10.4034/RBCS/2011.15.02.11>.
- CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; COSTA, J. P.; LOURENÇO, N. V.; SANTOS, C. C. M. P.; TOMÉ, A. R.; SOUSA, G. F.; SOUSA, D. P.; ALMEIDA, R. N.; FREITAS, R. M. Avaliação da toxicidade aguda e das alterações

histopatológicas em camundongos tratados com fitol. **Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl.**, v.33, n.3, p.421-428, 2012.

DA SILVA, A. O.; SAMPAIO, F. A.; DE QUEIROZ, I. P. C. S.; CONCEIÇÃO, K. N.; DA SILVA, V. F. Antioxidant power of carotenoids, flavonoids and vitamin e in preventing arteriosclerosis. **ReonFacema**, v.2, n.4, p.320-324, 2016.

DANTAS, A. J.; AMBIEL, R. C.; CUMAN, N. K. R.; BARONI, S.; BERSANI-AMADO, A. C. Valores de referências de alguns parâmetros fisiológicos de ratos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá, Estado do Pará. **Acta Sci. Health Sci**, v.28, n.2, p.165-170, 2006.

DEL RÉ, P. V.; JORGE, N. Especiarias como antioxidantes naturais: aplicações em alimentos e implicação na saúde. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.14, n.2, p.389-399, 2012. <http://dx.doi.org/10.1590/S1516-05722012000200021>.

FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE - FELASA. **Pain and distress in laboratory rodents and lagomorphs**. 1994. Disponível em: <http://journals.sagepub.com/doi/abs/10.1258/002367794780745308?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub%3Dpubmed>. Acesso em: 18 jan. 2018.

GONZALEZ, F. H. D.; SILVA, S. C. **Introdução à bioquímica clínica veterinária**. 2. ed. Porto Alegre: Editora da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006.

GRASSI, T. L. M.; SANTO, E. F. E.; MARCOS, M. T. S.; CAVAZZANA, J. F.; OLIVEIRA, D. L.; BOSSOLANI, I. L. C.; PONSANO, E. H. G. Bacterial pigment for Nile tilapia feeding. **Aquacult Int.**, v.24, p.647-660, 2016. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20151612>

HASCHEK, W. M.; WALLING, M. A.; ROUSSEAU, C. **Fundamentals of Toxicology Pathology: the liver**. 2nd ed. San Diego: Califórnia. Elsevier, 2010.

LALOR, P. F.; ADAMS, D. H. Adhesion of lymphocytes to hepatic endothelium. **Exp. Mol. Pathol.**, v.52, p.214-219, 1999. <http://dx.doi.org/10.1136/mp.52.4.214>

LALOR, P. F.; SHIELDS, P.; GRANT, A. J.; ADAMS, D. H. Recruitment of lymphocytes to the human liver. **Immunol. Cell Biol.**, v.80, p.52-64, 2002. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1440-1711.2002.01062.x>

LIMA, F. F.; TRAESEL, G. K.; MENEGATI, S. E. L. T.; SANTOS, A. C.; SOUZA, I. C.; 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 Res. Int.**, v.91, p.11-17, 2017. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.019>.

LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Rev. Bras. Farmacogn.**, v. 9, n.2A, p.403-11, 2009.

MELO, M. G. D.; DÓRIA, G. A. A.; SERAFINI, M. R.; ARAUJO, A. A. S. Valores de referência Hematológicos e Bioquímicos de Ratos (*Rattus norvegicus* linhagem Wistar) provenientes do biotério central da Universidade Federal de Sergipe. **Sci. Plena.**, v.8, n.4, 2012.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. p.1298.

NUNES, T.; BRUNETTA, D.; LEAL, C.; PISI, P.; RORIZ-FILHO, J. **Insuficiência renal aguda**. *Medicina (Ribeirão Preto. Online)*, v.43, n.3, p.272-282, 2010. <https://doi.org/10.11606/issn.2176-7262.v43i3p272-282>

Organization for Economic Cooperation and Development: OECD Guideline for testing of chemicals. **Acute oral toxicity-acute toxic class method, guideline no. 423**. Rome 2001. Disponível em: <https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/oced_gl423.pdf>. Acesso em: 15 dez. 2016.

Organization for Economic Cooperation and Development: OECD. **Test no. 407: repeated dose 28-day oral toxicity study in rodents**. Rome 2008. Disponível em: <<https://ntp.niehs.nih.gov/iccvam/suppdocs/feddocs/oced/ocedtg407-2008.pdf>>. Acesso em: 15 dez. 2016.

PONSANO, E. H. G.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C. From a pollutant by product to a feed ingredient. In: MATOVIC, D. (Ed) *Biomass – detection, production and usage*. **Rijeka: Intech**, 2011. p.461-472. <http://dx.doi.org/10.5772/19092>

QUARESMA, A. B.; D'ACAMPORA, A. J.; TRAMONTE, R.; DE FARIAS, D. C.; JOLY, F. S. Histological study of the liver and biochemistry of the blood of Wistar rats following ligation of right hepatic duct. **Acta Cir. Bras.**, v.22, n.1, p.68-78, 2007. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502007000100013>

REIS, M. R.; DE PAIVA, M. H. P.; BARBOSA, O. N.; BARROS, E. M. L.; LUZ, R. F.; VIANA, V. G. F. Histological study of the acute effects of colloidal silver in organs of Wistar rats. **Rev Enferm UFPI.**, v.6, n.1, p.9-13, 2017. <http://dx.doi.org/https://doi.org/10.26694/reufpi.v6i1.5778>

SANTO, E. F. E.; LIMA, L. K. F.; TORRES, A. P. C.; OLIVEIRA, G.; PONSANO, E. H. G. Comparison between freeze and spray drying to obtain powder *Rubrivivax gelatinosus* biomass. **Food Sci. Technol.**, v.33, n.1, p.47-51, 2013. <http://dx.doi.org/10.1590/S0101-20612013005000008>

SANTOS, A. C.; AZEVEDO, B. R. D. M. S.; PEREIRA, N. K.; IRULEGUI, R. D. S. C.; BARACHO, N. C. D. V. Efeitos cardiovasculares renais e hepáticos produzidos pela administração crônica de ayahuasca em ratos hipertensos/cardiovascular, Renal and hepatics effects produced by chronic administration of ayahuasca in hypertensive rats. **Rev. Cien. Saúde**, v.3, n.4, p.21-38, 2013. <http://dx.doi.org/10.21876/rcsfmit.v3i4.172>

SHARP, P.; VILLANO, J. S. **The laboratory rat**. 2. ed. USA: CRC, 2012.

STEVEN, L. S.; SCOTT, M. S. Urinary Sistem. **Fundamentals of veterinary clinical pathology**. Iowa: Iowa State, p.277-336, 2002.

THRALL, M. A. **Hematologia e Bioquímica Veterinária**. São Paulo: Rocca, 2007.

VALDUGA, E.; TATSCH, P. O.; TIGGEMANN, L.; TREICHEL, H.; TONIAZZO, G.; ZENI, J.; DI LUCCIO, M. Produção de carotenoides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quím. Nova**, v.32, p.2429-2436, 2009. <http://dx.doi.org/10.1590/S0100-40422009000900036>

ANEXO A – Certificado de aprovação do projeto pela comissão de ética no uso de animais.



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"**



**CAMPUS ARAÇATUBA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
FACULDADE DE MEDICINA VETERINÁRIA**

**CEUA - Comissão de Ética no Uso de Animais
CEUA - Ethics Committee on the Use of Animals**

CERTIFICADO

Certificamos que o Projeto de Pesquisa intitulado "**Ensaio toxicológico in vivo da biomassa de Rubrivivax gelatinosus em ratas**", Processo FOA nº 00218-2017, sob responsabilidade de Elisa Helena Giglio Ponsano apresenta um protocolo experimental de acordo com os Princípios Éticos da Experimentação Animal e sua execução foi aprovada pela CEUA em 19 de Abril de 2017.

VALIDADE DESTE CERTIFICADO: 02 de Maio de 2018.

DATA DA SUBMISSÃO DO RELATÓRIO FINAL: até 02 de Junho de 2018.

CERTIFICATE

We certify that the study entitled "**In vivo toxicity test of the biomass of Rubrivivax gelatinosus in rats**", Protocol FOA nº 00218-2017, under the supervision of Elisa Helena Giglio Ponsano presents an experimental protocol in accordance with the Ethical Principles of Animal Experimentation and its implementation was approved by CEUA on April 19, 2017.

VALIDITY OF THIS CERTIFICATE: May 02, 2018.

DATE OF SUBMISSION OF THE FINAL REPORT: June 02, 2018.

Prof. Ass. Dr. Leonardo Perez Faverani
Coordenador da CEUA
CEUA Coordinator

ANEXO B – Normas de publicação dos artigos - Food and Chemical Toxicology (Journal)



FOOD AND CHEMICAL TOXICOLOGY

DESCRIPTION

Food and Chemical Toxicology (FCT), an internationally renowned journal, that publishes original research articles and reviews on **toxic effects**, in animals and humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on **food, drugs, and chemicals, including agricultural and industrial safety, and consumer product safety**. Areas such as safety evaluation of **novel foods and ingredients, biotechnologically-derived products, and nanomaterials** are included in the scope of the journal. FCT also encourages submission of papers on **inter-relationships between nutrition and toxicology** and on *in vitro* techniques, particularly those fostering the **3 Rs**.

The principal aim of the journal is to publish high impact, scholarly work and to serve as a multidisciplinary forum for research in toxicology. Papers submitted will be judged on the basis of scientific originality and contribution to the field, quality and subject matter. **Studies should address at least one of the following:** Adverse physiological/biochemical, or pathological changes induced by **specific defined** substances New techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology Mechanisms underlying toxic phenomena Toxicological examinations of specific chemicals or consumer products, both those showing adverse effects and those demonstrating safety, that meet current standards of scientific acceptability.

Authors must **clearly and briefly identify what novel toxic effect (s) or toxic mechanism (s)** of the chemical are being reported and what their **significance** is in the abstract. Furthermore, sufficient doses should be included in order to provide information on NOAEL/LOAEL values.

Manuscripts describing research involving the following areas will not be considered: materials/substances of only local interest materials/substances for which the chemical composition is not clearly defined only pharmacological properties, or potentially beneficial effects using *in vitro* or *in vivo* systems chemical analyses of toxins in foods without addressing the toxic implication to humans [risk assessment should be included] unrealistic human doses, inappropriate route of exposure, or *in vitro* experiments that do not reflect serum levels in humans.

FCT is committed to the highest standards. Only papers that have not been previously published, that fit in the above mentioned scope, and that have been reviewed by experts in the field prior to publication will be accepted. Cover letters must state that the manuscript is new and original and not under consideration for publication elsewhere. Co-authors should be individuals who have contributed substantially to the content of the papers. All authors must declare any potential conflict of interest and all financial support.

Benefits to authors

We provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click [here](#) for more information on our author services. Please see the Guide for Authors for information on article submission. If you require further information or help, please visit our Support Center

AUDIENCE

Food scientists, toxicologists, chemists and researchers working in the pharmaceutical industry.

IMPACT FACTOR

2016: 3.778 © Clarivate Analytics Journal Citation Reports 2017

ABSTRACTING AND INDEXING

EMBiology
Analytical Abstracts

Aqualine Abstracts
 BIOSIS
 Elsevier BIOBASE
 Cambridge Scientific Abstracts
 Chemical Abstracts
 Chemical Hazards in Industry
 Current Contents/BIOMED Database
 Current Contents/Science Citation Index
 Current Contents/SciSearch Database
 EMBASE
 Health and Safety Science Abstracts
 MEDLINE®
 International Packaging Abstracts
 Research Alert
 Toxicology Abstracts
 Scopus

EDITORIAL BOARD

Editor-in-Chief

José L. Domingo, Lab.Toxicology and Environmental Health, School of Medicine, IISPV, Universitat Rovira I Virgili, Sant Llorenç 21, 43201, Reus, Catalonia, Spain

Co-Editors

Michael Aschner, Dept. of Molecular Pharmacology, Albert Einstein College of Medicine, 1300 Morris Park Avenue, Bronx, New York, NY 10461, USA

Bryan Delaney, Research Fellow – Toxicology, DuPont Pioneer, Global Industry Affairs and Regulatory, 7100 NW 62nd Avenue, Johnston, Iowa, 50131, USA

Siegfried Knasmüller, Inst. of Cancer Research, Environmental Toxicology Group, Medical University Vienna, Inner Medicine I, Borschkegasse 8a, A-1090, Vienna, Austria

Chada Reddy, Dept. of Biomedical Sciences, University of Missouri, E102 Veterinary Medical Building, 1600 Rollins, Columbia, Missouri, 65211, USA

RIFM Guest Editor

Aristides Tsatsakis, Dept. of Forensic Sciences and Toxicology, University of Crete, 71409, Heraklion, Greece.

Associate Editors

Silvia Berlanga de Moraes Barros, School of Pharmaceutical Sciences, Universidade de São Paulo, Av.Prof.Lineu Prestes, 580, 05508-000 São Paulo, Brazil

Qasim Chaudhry, DEFRA Central Science Laboratory, The Food and Environment Research Agency, Sand Hutton, York, YO41 1LZ, UK

Roger Clemens, University of Southern California School of Pharmacy, Los Angeles, California, USA

Mark Feeley, Bureau of Chemical Safety, Chemical Hazard Assessment Division, Health Canada, Tunney's Pasture, Ottawa, K1A OL2, Ontario, Canada

Swaran Jeet Singh Flora, National Institute of Pharmaceutical Education and Research, Shree Bhawani Paper Mill Road - ITI compound, 229010, Raebareli, India

Guillermina Font, Fac. of Pharmacy, Dept. of Preventive Medicine, Universitat de València, Avda Vicent Andres Estelles s/n, Burjassot, , 46100, Valencia, Spain

Milen Georgiev, Inst. of Microbiology, Bulgarian Academy of Sciences, 139 Ruski Boulevard, 4000, Plovdiv, Bulgaria

Salmaan Inayat-Hussain, Group Health, Safety and Environment Division, Head, Global Toxicology, Petroliaam Nasional Berhad, Level 45, Tower 1, PETRONAS Twin Towers, KLCC, 50088, Kuala Lumpur, Malaysia

Demetrios Kouretas, Dept. of Biochemistry & Biotechnology, University of Thessaly, Larissa, Greece

Claire L. Kruger, Director of Health Sciences, Spherix Incorporated, 6430 Rockledge Dr., Westmoreland Bldg. #503, Bethesda, MD 20817, USA

Byung-Mu Lee, College of Pharmacy, Div. of Toxicology, Sungkyunkwan University (SKKU), Cheoncheon-dong 300, 440-746, Suwon, Gyeonggi-do, The Republic of Korea

Palma Ann Marone, Toxicology and Pathology Associates, LLC, Pharmacology and Toxicology, Virginia Commonwealth University, School of Medicine

Yeonhwa Park, Dept. of Food Science, University of Massachusetts at Amherst, Amherst, Massachusetts, MA, USA

Ivonne M.C.M. Rietjens, Sectie Toxicologie, Agrotechnologie en voedingswetenschappen (AFSG), Wageningen Universiteit, Postbus 8000, Bodenummer 92, 6700 EA, Wageningen, Netherlands

Saura Sahu, Office of Applied Research and Safety Assessment, FDA, Center for Food Safety and Applied Nutrition, 8301 Muirkirk Road, Laurel, Maryland, 20708, USA

Dieter Schrenk, Dept. of Food Chemistry and Environmental Toxicology, Technische Universität Kaiserslautern, Erwin-Schroedinger-Str. 52, D-67663, Kaiserslautern, Germany

Emeritus Editors

Alan R. Boobis, Experimental Medicine and Toxicology, Div. of Investigative Science, Imperial College London, Hammersmith Campus, Du Cane Road, W12 0NN, London, UK

Joseph F. Borzelleca, President, Toxicology & Pharmacology, Inc., 8718 September Drive, Richmond, Virginia, VA 23229-7319, USA

A. Wallace Hayes, Dept. of Environmental Health, Harvard T.H. Chan School of Public Health, 300 Longwood Ave., Boston, Massachusetts, MA 02115-5747, USA

Hans Verhagen, Centre for Nutrition and Health (PB84), Rijksinstituut voor Volksgezondheid en Milieu (RIVM), Postbus 1, 3720 BA Bilthoven, Netherlands

Founding Editor

The late Leon Golberg

International Editorial Board

M.A. Abdelmegeed, Bethesda, Maryland, USA

N. Arora, New Delhi, India

S.M. Barlow

A. Bartholomaeus, Canberra, Australia

N. Basaran, Sıhhiye, Ankara, Turkey

M. Battino, Ancona, Italy

A. Braeuning, Berlin, Germany

F. Carvalho, Porto, Portugal

M. Clift, Swansea, UK

T.F.X. Collins, Chevy Chase, Maryland, USA

A. Covaci, Wilrijk, Belgium

D. Dandekar, Stilwell, Kansas, USA

M. Das, Lucknow, India

B. Delclos, Jefferson, Arkansas, USA

D. Doerge, Jefferson, Arkansas, USA

M. Dusinska, Kjeller, Norway

M. Ferrante, Catania, Italy

I.C.F.R Ferreira, Bragança, Portugal

M. Filipic, Ljubljana, Slovenia

K. S. Golokhvast, Vladivostok, Russian Federation

K. Kuca, Hradec Kralove, Czech Republic

P. Magee, Coleraine Co., Londonderry, Northern Ireland, UK

H.I. Maibach, San Francisco, California, USA

A. Mantovani, Rome, Italy

A.I. Nikiforov, Charlottesville, Virginia, USA

A. Tsakalof, Larissa, Greece

L.G. Valerio, Jr., Silver Spring, Maryland, USA

P. White, Ottawa, Ontario, Canada

J. Xiao, Taipa, Macau, China

GUIDE FOR AUTHORS

.

Your Paper Your Way

We now differentiate between the requirements for new and revised submissions. You may choose to submit your manuscript as a single Word or PDF file to be used in the refereeing process. Only when your paper is at the revision stage, will you be requested to put your paper in to a 'correct format' for acceptance and provide the items required for the publication of your article.

To find out more, please visit the Preparation section below.

INTRODUCTION

Food and Chemical Toxicology (FCT), an internationally renowned journal, aspires to publish original research articles and reviews on **toxic effects**, in animals or humans, of natural or synthetic chemicals occurring in the human environment with particular emphasis on **food, drugs, and chemicals, including agricultural and industrial safety, and consumer product safety**. Areas such as safety evaluation of **novel foods and ingredients, biotechnologically-derived products, and nanomaterials** are included in the scope of the journal. FCT also encourages submission of papers on **inter-relationships between nutrition and toxicology** and on *in vitro* techniques, particularly those fostering the **3 Rs**.

The principal aim of the journal is to publish high impact, scholarly work and to serve as a multidisciplinary forum for research in toxicology. Papers submitted will be judged on the basis of scientific originality and contribution to the field, quality and subject matter. Studies should address at least one of the following: Physiological, biochemical, or pathological changes induced by specific substances Techniques for assessing potential toxicity, including molecular biology Mechanisms underlying toxic phenomena Toxicological examinations of specific chemicals or consumer products, both those showing adverse effects and those demonstrating safety, that meet current standards of scientific acceptability.

Manuscripts concerning materials/substances of only local interest for which the chemical composition of the material/substance is **not clearly defined** will **not** be considered. Manuscripts addressing only pharmacological properties, or only potentially beneficial effects using in *in vitro* or *in vivo* systems, are not within the scope of the journal.

FCT is committed to the highest standards. Only papers that have not been previously published, that fit in the above mentioned scope, and that have been reviewed by experts in the field prior to publication will be accepted. Cover letters must state that the paper is new and original and not under consideration for publication elsewhere. Papers pending in other journals will not be considered. Coauthors should be individuals who have contributed substantially to the content of the papers.

Types of paper

The Journal's main purpose is the publication of papers reporting and interpreting original unpublished toxicological research, particularly studies promoting an understanding of the mechanisms underlying toxic effects or improvements in methods for predicting adverse effects. Papers reporting the toxicological examination of specific foods, chemicals or consumer products will be published, irrespective of the positive or negative nature of the results, provided the tests and reporting meet current standards of acceptability. In addition, Short Communications will also be considered, as will concise interpretative Reviews of toxicological topics of contemporary significance. Letters to the Editor will be limited to comments on contributions already published in the journal; if a letter is accepted, a response (for simultaneous publication) will be invited from the authors of the original contribution. All Letters to the Editor should be submitted to the Editor in Chief, Jose L. Domingo through the online submission system of the Journal.

Submission checklist

You can use this list to carry out a final check of your submission before you send it to the journal for review. Please check the relevant section in this Guide for Authors for more details.

Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded:

Manuscript:

- Include keywords
- All figures (include relevant captions)
- All tables (including titles, description, footnotes)
- Ensure all figure and table citations in the text match the files provided
- Indicate clearly if color should be used for any figures in print

Graphical Abstracts / Highlights files (where applicable)

Supplemental files (where applicable)

Further considerations

- Manuscript has been 'spell checked' and 'grammar checked'

- All references mentioned in the Reference List are cited in the text, and vice versa
 - Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)
 - A competing interests statement is provided, even if the authors have no competing interests to declare
 - Journal policies detailed in this guide have been reviewed
 - Referee suggestions and contact details provided, based on journal requirements
- For further information, visit our Support Center.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

Please see our information pages on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication.

Human and animal rights

If the work involves the use of human subjects, the author should ensure that the work described has been carried out in accordance with The Code of Ethics of the World Medical Association (Declaration of Helsinki) for experiments involving humans; Uniform Requirements for manuscripts submitted to Biomedical journals. Authors should include a statement in the manuscript that informed consent was obtained for experimentation with human subjects. The privacy rights of human subjects must always be observed.

All animal experiments should comply with the ARRIVE guidelines and should be carried out in accordance with the U.K. Animals (Scientific Procedures) Act, 1986 and associated guidelines, EU Directive 2010/63/EU for animal experiments, or the National Institutes of Health guide for the care and use of Laboratory animals (NIH Publications No. 8023, revised 1978) and the authors should clearly indicate in the manuscript that such guidelines have been followed.

Conflict of interest

Food and Chemical Toxicology follows the ICMJE recommendations regarding conflict of interest disclosures. All authors are required to report the following information with each submission: All thirdparty financial support for the work in the submitted manuscript. All financial relationships with any entities that could be viewed as relevant to the general area of the submitted manuscript. All sources of revenue with relevance to the submitted work who made payments to you, or to your institution on your behalf, in the 36 months prior to submission. Any other interactions with the sponsor of outside of the submitted work should also be reported. Any relevant patents or copyrights (planned, pending, or issued). Any other relationships or affiliations that may be perceived by readers to have influenced, or give the appearance of potentially influencing, what you wrote in the submitted work.

As a general guideline, it is usually better to disclose a relationship than not. This information will be acknowledged at publication in a Transparency Document. Additional information on the ICMJE recommendations can be found at: <http://www.icmje.org>. The form for conflict of interest disclosure can be downloaded here, or at http://www.icmje.org/coi_disclosure.pdf (if this link does not display properly in your browser, please right-click the link and select "Save Target As..." or "Save Link as..." from the popup menu.)

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <http://www.elsevier.com/postingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Each manuscript must also be accompanied by a cover letter outlining the basic findings of the paper and their significance. Furthermore, it is understood that with submission of this article the authors have complied with the institutional policies governing the humane and ethical treatment of the experimental subjects (i.e. animals and human subjects), and that they are willing to share the original data and materials if so requested.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors **before** submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only **before** the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must

receive the following from the **corresponding author**: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors **after** the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Article transfer service

This journal is part of our Article Transfer Service. This means that if the Editor feels your article is more suitable in one of our other participating journals, then you may be asked to consider transferring the article to one of those. If you agree, your article will be transferred automatically on your behalf with no need to reformat. Please note that your article will be reviewed again by the new journal.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (see more information on this). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations. If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (more information). Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license.

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. More information.

Elsevier supports responsible sharing

Find out how you can share your research published in Elsevier journals.

Role of the funding source

You are required to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated. Please see <http://www.elsevier.com/funding>.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some funding bodies will reimburse the author for the Open Access Publication Fee. Details of existing agreements are available online.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Subscription

- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs.
- No open access publication fee payable by authors.

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse.
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf, e.g. by their research funder or institution.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses: *Creative Commons Attribution (CC BY)*

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article. The open access publication fee for this journal is **USD 2800**, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information. Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form. Find out more.

This journal has an embargo period of 12 months.

Elsevier Researcher Academy

Researcher Academy is a free e-learning platform designed to support early and mid-career researchers throughout their research journey. The "Learn" environment at Researcher Academy offers several interactive modules, webinars, downloadable guides and resources to guide you through the process of writing for research and going through peer review. Feel free to use these free resources to improve your submission and navigate the publication process with ease.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Referees

The Editors require submissions by the authors of the names and addresses of 4 potential reviewers for this submission. The institutional address and e-mail address are required. At least 2 of the referees should be from a different country to the corresponding author's. The Editors reserve the right to use these or other reviewers.

PREPARATION

NEW SUBMISSIONS

Submission to this journal proceeds totally online and you will be guided stepwise through the creation and uploading of your files. The system automatically converts your files to a single PDF file, which is used in the peer-review process.

As part of the Your Paper Your Way service, you may choose to submit your manuscript as a single file to be used in the refereeing process. This can be a PDF file or a Word document, in any format or layout that can be used by referees to evaluate your manuscript. It should contain high enough quality figures for refereeing. If you prefer to do so, you may still provide all or some of the source files at the initial submission. Please note that individual figure files larger than 10 MB must be uploaded separately.

References

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title,

chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct.

Formatting requirements

There are no strict formatting requirements but all manuscripts must contain the essential elements needed to convey your manuscript, for example Abstract, Keywords, Introduction, Materials and Methods, Results, Conclusions, Artwork and Tables with Captions. If your article includes any Videos and/or other Supplementary material, this should be included in your initial submission for peer review purposes.

Divide the article into clearly defined sections. Please ensure the text of your paper is double-spaced—this is an essential peer review requirement.

Figures and tables embedded in text

Please ensure the figures and the tables included in the single file are placed next to the relevant text in the manuscript, rather than at the bottom or the top of the file. The corresponding caption should be placed directly below the figure or table.

Peer review

This journal operates a single blind review process. All contributions will be initially assessed by the editor for suitability for the journal. Papers deemed suitable are then typically sent to a minimum of two independent expert reviewers to assess the scientific quality of the paper. The Editor is responsible for the final decision regarding acceptance or rejection of articles. The Editor's decision is final. More information on types of peer review.

REVISED SUBMISSIONS

Use of word processing software

Regardless of the file format of the original submission, at revision you must provide us with an editable file of the entire article. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier). See also the section on Electronic artwork. To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient details to allow the work to be reproduced by an independent researcher. Methods that are already published should be summarized, and indicated by a reference. If quoting directly from a previously published method, use quotation marks and also cite the source. Any modifications to existing methods should also be described.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Essential title page information

- **Title.** Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- **Author names and affiliations.** Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. You can add your name between parentheses in your own script behind the English transliteration. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- **Corresponding author.** Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. This responsibility includes answering any future queries about Methodology and Materials. **Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.**
- **Present/permanent address.** If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Graphical abstract

Although a graphical abstract is optional, its use is encouraged as it draws more attention to the online article. The graphical abstract should summarize the contents of the article in a concise, pictorial form designed to capture the attention of a wide readership. Graphical abstracts should be submitted as a separate file in the online submission system. Image size: Please provide an image with a minimum of 531 × 1328 pixels (h × w) or proportionally more. The image should be readable at a size of 5 × 13 cm using a regular screen resolution of 96 dpi. Preferred file types: TIFF, EPS, PDF or MS Office files. You can view Example Graphical Abstracts on our information site. Authors can make use of Elsevier's Illustration Services to ensure the best presentation of their images and in accordance with all technical requirements.

Highlights

Please amend your research highlights so that they consist of 3 to 5 brief bullet points which convey the core findings of your work. Please ensure EACH bullet point does NOT exceed 125 characters (including spaces). An example is given below:

RESEARCH HIGHLIGHTS EXAMPLE:

* Research highlights are a mandatory field of a submitted paper & therefore should not exceed 85 characters including spaces.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using British spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Abbreviations

Abbreviations should be used sparingly; they should be defined when first used in the paper but also listed in alphabetical order under *Abbreviations* as a footnote to the title page (see above).

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Nomenclature and units

All measurements should be expressed in metric, preferably SI, units. Test chemicals and enzymes must be clearly identified, IUPAC and CAS names being used, wherever possible with the aid of CAS Registry and EC numbers. Pesticides should be referred to be their ISO names and human and veterinary drugs by their INNs.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors build footnotes into the text, and this feature may be used. Should this not be the case, indicate the position of footnotes in the text and present the footnotes themselves separately at the end of the article.

Artwork

Electronic artwork

General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Preferred fonts: Arial (or Helvetica), Times New Roman (or Times), Symbol, Courier.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Indicate per figure if it is a single, 1.5 or 2-column fitting image.
- For Word submissions only, you may still provide figures and their captions, and tables within a single file at the revision stage.
- Please note that individual figure files larger than 10 MB must be provided in separate source files. A detailed guide on electronic artwork is available.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here.

Formats

Regardless of the application used, when your electronic artwork is finalized, please 'save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):

EPS (or PDF): Vector drawings. Embed the font or save the text as 'graphics'.

TIFF (or JPG): Color or grayscale photographs (halftones): always use a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPG): Bitmapped line drawings: use a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale): a minimum of 500 dpi is required.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); the resolution is too low.
- Supply files that are too low in resolution.
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. **For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article.**

Please

indicate your preference for color: in print or online only. Further information on the preparation of electronic artwork.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. A caption should comprise a brief title (**not** on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules and shading in table cells.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Reference links

Increased discoverability of research and high quality peer review are ensured by online links to the sources cited. In order to allow us to create links to abstracting and indexing services, such as Scopus, CrossRef and PubMed, please ensure that data provided in the references are correct. Please note that incorrect surnames, journal/book titles, publication year and pagination may prevent link creation. When copying references, please be careful as they may already contain errors. Use of the DOI is encouraged. A DOI can be used to cite and link to electronic articles where an article is in-press and full citation details are not yet known, but the article is available online. A DOI is guaranteed never to change, so you can use it as a permanent link to any electronic article. An example of a citation using DOI for an article not yet in an issue is: VanDecar J.C., Russo R.M., James D.E., Ambeh W.B., Franke M. (2003). Aseismic continuation of the Lesser Antilles slab beneath northeastern Venezuela. *Journal of Geophysical Research*, <https://doi.org/10.1029/2001JB000884>. Please note the format of such citations should be in the same style as all other references in the paper.

Data references

This journal encourages you to cite underlying or relevant datasets in your manuscript by citing them in your text and including a data reference in your Reference List. Data references should include the following elements: author name(s), dataset title, data repository, version (where available), year, and global persistent identifier. Add [dataset] immediately before the reference so we can properly identify it as a data reference. The [dataset] identifier will not appear in your published article.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles, such as Mendeley and Zotero, as well as EndNote. Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style.

If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/food-and-chemical-toxicology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference formatting

There are no strict requirements on reference formatting at submission. References can be in any style or format as long as the style is consistent. Where applicable, author(s) name(s), journal title/book title, chapter title/article title, year of publication, volume number/book chapter and the pagination must be present. Use of DOI is highly encouraged. The reference style used by the journal will be applied to the accepted article by Elsevier at the proof stage. Note that missing data will be highlighted at proof stage for the author to correct. If you do wish to format the references yourself they should be arranged according to the following examples:

Reference style

Text: All citations in the text should refer to:

1. *Single author:* the author's name (without initials, unless there is ambiguity) and the year of publication;

2. *Two authors*: both authors' names and the year of publication;
3. *Three or more authors*: first author's name followed by 'et al.' and the year of publication. Citations may be made directly (or parenthetically). Groups of references should be listed first alphabetically, then chronologically.

Examples: 'as demonstrated (Allan, 2000a, 2000b, 1999; Allan and Jones, 1999). Kramer et al. (2010) have recently shown' *List*: References should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J.A.J., Lupton, R.A., 2010. The art of writing a scientific article. *J. Sci. Commun.* 163, 51–59.

Reference to a book:

Strunk Jr., W., White, E.B., 2000. *The Elements of Style*, fourth ed. Longman, New York.

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G.R., Adams, L.B., 2009. How to prepare an electronic version of your article, in: Jones, B.S., Smith, R.Z. (Eds.), *Introduction to the Electronic Age*. E-Publishing Inc., New York, pp. 281–304.

Reference to a website:

Cancer Research UK, 1975. Cancer statistics reports for the UK. <http://www.cancerresearchuk.org/aboutcancer/statistics/cancerstatsreport/> (accessed 13 March 2003).

Reference to a dataset:

[dataset] Oguro, M., Imahiro, S., Saito, S., Nakashizuka, T., 2015. Mortality data for Japanese oak wilt disease and surrounding forest compositions. *Mendeley Data*, v1. <https://doi.org/10.17632/xwj98nb39r.1>.

Journal abbreviations source

Journal names should be abbreviated according to the List of Title Word Abbreviations.

Video

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the file in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB per file, 1 GB in total. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

Supplementary material

Supplementary material such as applications, images and sound clips, can be published with your article to enhance it. Submitted supplementary items are published exactly as they are received (Excel or PowerPoint files will appear as such online). Please submit your material together with the article and supply a concise, descriptive caption for each supplementary file. If you wish to make changes to supplementary material during any stage of the process, please make sure to provide an updated file. Do not annotate any corrections on a previous version. Please switch off the 'Track Changes' option in Microsoft Office files as these will appear in the published version.

RESEARCH DATA

This journal encourages and enables you to share data that supports your research publication where appropriate, and enables you to interlink the data with your published articles. Research data refers to

the results of observations or experimentation that validate research findings. To facilitate reproducibility and data reuse, this journal also encourages you to share your software, code, models, algorithms, protocols, methods and other useful materials related to the project.

Below are a number of ways in which you can associate data with your article or make a statement about the availability of your data when submitting your manuscript. If you are sharing data in one of these ways, you are encouraged to cite the data in your manuscript and reference list. Please refer to the "References" section for more information about data citation. For more information on depositing, sharing and using research data and other relevant research materials, visit the research data page.

Data linking

If you have made your research data available in a data repository, you can link your article directly to the dataset. Elsevier collaborates with a number of repositories to link articles on ScienceDirect with relevant repositories, giving readers access to underlying data that gives them a better understanding of the research described.

There are different ways to link your datasets to your article. When available, you can directly link your dataset to your article by providing the relevant information in the submission system. For more information, visit the database linking page.

For supported data repositories a repository banner will automatically appear next to your published article on ScienceDirect.

In addition, you can link to relevant data or entities through identifiers within the text of your manuscript, using the following format: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN).

Mendeley Data

This journal supports Mendeley Data, enabling you to deposit any research data (including raw and processed data, video, code, software, algorithms, protocols, and methods) associated with your manuscript in a free-to-use, open access repository. Before submitting your article, you can deposit the relevant datasets to *Mendeley Data*. Please include the DOI of the deposited dataset(s) in your main manuscript file. The datasets will be listed and directly accessible to readers next to your published article online.

For more information, visit the Mendeley Data for journals page.

Data in Brief

You have the option of converting any or all parts of your supplementary or additional raw data into one or multiple data articles, a new kind of article that houses and describes your data. Data articles ensure that your data is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. You are encouraged to submit your article for *Data in Brief* as an additional item directly alongside the revised version of your manuscript. If your research article is accepted, your data article will automatically be transferred over to *Data in Brief* where it will be editorially reviewed and published in the open access data journal, *Data in Brief*. Please note an open access fee of 500 USD is payable for publication in *Data in Brief*. Full details can be found on the Data in Brief website. Please use this template to write your Data in Brief.

MethodsX

You have the option of converting relevant protocols and methods into one or multiple Methods X articles, a new kind of article that describes the details of customized research methods. Many researchers spend a significant amount of time on developing methods to fit their specific needs or setting, but often without getting credit for this part of their work. MethodsX, an open access journal, now publishes this information in order to make it searchable, peer reviewed, citable and reproducible. Authors are encouraged to submit their MethodsX article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your methods article will automatically be transferred over to MethodsX where it will be editorially reviewed. Please note an open access fee is payable for publication in MethodsX. Full details can be found on the MethodsX website. Please use this template to prepare your Methods X article.

Data statement

To foster transparency, we encourage you to state the availability of your data in your submission. This may be a requirement of your funding body or institution. If your data is unavailable to access or unsuitable to post, you will have the opportunity to indicate why during the submission process, for example by stating that the research data is confidential. The statement will appear with your published article on ScienceDirect. For more information, visit the Data Statement page.

Audio Slides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Interactive plots

This journal enables you to show an Interactive Plot with your article by simply submitting a data file. Full instructions.

AFTER ACCEPTANCE

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor.

Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author will, at no cost, receive a customized Share Link providing 50 days free access to the final published version of the article on ScienceDirect. The Share Link can be used for sharing the article via any communication channel, including email and social media. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's Webshop. Corresponding authors who have published their article open access do not receive a Share Link as their final published version of the article is available open access on ScienceDirect and can be shared through the article DOI link.

AUTHOR INQUIRIES

Visit the Elsevier Support Center to find the answers you need. Here you will find everything from Frequently Asked Questions to ways to get in touch.

You can also check the status of your submitted article or find out when your accepted article will be published.