UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da atividade antimutagênica do
beta-caroteno microencapsulado em células de ratos
tratados com o antitumoral doxorrubicina
empregando os ensaios de micronúcleo e cometa**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Mestre em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes
Pires Bianchi

Orientado: Alexandre Ferro Aissa

Ribeirão Preto
2010

RESUMO

AISSA, A. F. Avaliação da atividade antimutagênica do beta-caroteno microencapsulado em células de ratos tratados com o antitumoral doxorrubicina empregando os ensaios de micronúcleo e cometa. 2010. 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os corantes são muito usados na indústria alimentícia. Podendo ser de origem natural ou sintética, estes são utilizados na produção de alimentos no intuito de compensar a perda da cor durante a fabricação e estocagem, garantir a uniformidade da cor e também de atribuir coloração àqueles originalmente incolores. Dentre os pigmentos naturais, o beta-caroteno (BC) tem sido um dos mais adicionados em alimentos. Por outro lado, a utilização do BC é limitada devido à sua instabilidade. Por essa razão, técnicas de microencapsulamento são muito utilizadas, pois podem proteger o material microencapsulado de ações oxidantes, prolongando a propriedade do composto. Porém, nestes processos tecnológicos, as propriedades do composto encapsulado devem ser cuidadosamente estudadas. O objetivo deste trabalho foi comparar a possível ação antimutagênica do BC puro e na forma microencapsulada (BCM) por meio do teste do micronúcleo em células da medula óssea e sangue periférico, e por meio do ensaio do cometa em rins e fígado de ratos tratados com o antitumoral doxorrubicina (DXR). Para isso, o tratamento foi feito com duas doses do carotenóide (2,5 ou 5 mg/kg) puro ou microencapsulado, por gavagem durante 14 dias, seguida de injeção intraperitoneal de salina ou do antitumoral DXR (16 mg/kg), logo após a última gavagem. Ratos Wistar machos foram divididos em 14 grupos de tratamentos (n=6/grupo), e foram sacrificados 24h após a injeção intraperitoneal. Os resultados com o teste do micronúcleo nos dois tecidos mostram que o BC não foi mutagênico, exceto na dose de 5mg/kg. No BCM as doses não foram mutagênicas e na associação BCM+DXR apenas a maior dose foi antimutagênica. Os resultados com o teste do cometa nos rins e fígado mostram que o BC não foi genotóxico e quando associado à DXR obteve valores de proteção semelhantes aos resultados obtidos com o controle solvente (óleo de milho). O BCM também não foi genotóxico em qualquer dos tecidos. Quando associado à DXR as duas doses tiveram efeito protetor contra a fragmentação do DNA no fígado. No rim, a dose BCM 2,5mg+DXR foi genotóxica e a dose BCM 5mg+DXR foi antigenotóxica. A antimutagenicidade observada pode ser explicada pela ação antioxidante do beta-caroteno. No entanto, quando uma dose alta é utilizada, os produtos de clivagem do carotenóide podem aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio induzindo ainda mais a formação de micronúcleos. A diferença entre os resultados obtidos com as duas doses do BC e do BCM indicam que, talvez, a biodisponibilidade do carotenóide foi alterada pelo processo de microencapsulamento. No entanto, o efeito protetor observado em uma das doses do BCM pode ser explicado pela capacidade antioxidante do beta-caroteno, mesmo na forma microencapsulada. Em conclusão, o BC puro não deve ser utilizado em altas doses, pois aumenta o dano ao DNA e quando microencapsulado não perde suas propriedades, porém uma dose maior deve ser utilizada para que o carotenóide tenha efeito antimutagênico.

Palavras chave: genotoxicidade, mutagenicidade, fígado, rim, corante, medula óssea

1. INTRODUÇÃO

1.1 Os carotenóides

Nas últimas décadas a fabricação e o preparo de alimentos têm se modificado muito, principalmente quanto às suas formas de distribuição e de apresentação ao consumidor. No passado, os alimentos provinham da região onde eram produzidos ou de regiões muito próximas. Atualmente, boa parte dos alimentos é proveniente de regiões longínquas e necessitam, freqüentemente, de aditivos e conservadores para manter a sua integridade (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Aditivos são substâncias adicionadas ao alimento em qualquer estágio de sua produção, processamento, embalagem, transporte ou armazenamento (RANDHAWA; BAHNA, 2009). Historicamente, os aditivos alimentares eram de origem natural, depois os aditivos sintéticos foram gradualmente introduzidos e sua utilização se tornou predominante. Centenas de aditivos, sintéticos ou naturais, são usados atualmente na indústria alimentícia. Porém, o interesse recente em produtos naturais tem levado ao aumento no uso de substâncias provenientes de plantas e animais (RANDHAWA; BAHNA, 2009).

Os pigmentos e corantes são muito usados na indústria alimentícia, com o objetivo de melhorar a apresentação do alimento ao consumidor. Podendo ser de origem natural ou sintética, estes são utilizados na produção de alimentos e bebidas no intuito de compensar a perda da cor durante a fabricação e estocagem, garantir a uniformidade da cor e também de atribuir coloração àqueles originalmente incolores (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001).

Devido à crescente busca dos consumidores por produtos naturais, a substituição de corantes sintéticos por naturais tem se tornado muito interessante na indústria alimentícia (MAPARI; MEYER; THRANE, 2009). Os países da União Européia proibiram o uso de alguns corantes sintéticos em alimentos (WANG et al., 2009). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou recentemente a Resolução RDC 41/2009, restringindo o uso de corante e aromas em bebidas alcoólicas (BRASIL, 2009). O uso de

aromatizantes sintéticos e de corantes está proibido em licores, aperitivos e bebidas mistas derivadas da uva e do vinho com graduação alcoólica de até 15%. Além de atribuir cor aos alimentos que os contém, muitos corantes naturais têm propriedades benéficas à saúde humana. Com isso, sua utilização torna-se muito conveniente, pois além de melhorar a aparência dos alimentos, podem ajudar a promover a saúde de quem se alimenta destes produtos (REDDY; ALEXANDER-LINDO; NAIR, 2005). Adicionalmente, as propriedades antioxidantes de corantes naturais podem ainda proteger os alimentos, prevenindo a oxidação de matérias primas alimentares, como óleos, carnes, leite e seus derivados, estendendo a sua vida-de-prateleira (DECKER et al., 2005).

Dados epidemiológicos mostraram a associação entre a ingestão de frutas e vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de diversas desordens crônico-degenerativas, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, cânceres, diabetes e outras, sendo os pigmentos um dos grupos de compostos bioativos aos quais são atribuídas tais ações (CALABRESE et al., 2008; BALSANO; ALISI, 2009; YNGVE, 2009). Os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados, mas de maneira geral, a redução do risco dessas doenças envolve a redução ou inibição de reações de oxidação e a inibição do processo de estresse oxidativo celular.

O estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio, como radicais livres e oxigênio singlete pode causar danos ao DNA que, se não forem reparados, resultam em mutações, quebras, ligações cruzadas, e rearranjos do cromossomo e por fim, na indução de câncer. Da mesma forma, danos oxidativos em grandes moléculas de proteínas, lipídios e lipoproteínas têm sido associados ao desenvolvimento de aterosclerose e reações inflamatórias por diversos mecanismos. Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura sobre a modulação de corantes, pigmentos e extratos encontrados na dieta sobre a indução de danos cromossômicos e possíveis efeitos antimutagênicos e antioxidantes (ANTUNES;

ARAÚJO, 2000). Estudo feito por Sasaki et al. (2002) analisou a genotoxicidade de 39 aditivos alimentares, entre eles alguns corantes, em oito tecidos de camundongos por meio do ensaio do cometa. Os corantes foram os mais genotóxicos entre todos os aditivos estudados. Os corantes amaranço, vermelho allura, “*New Coccine*”, tartrazina, eritrosina, flocina, e rosa bengala induziram dano ao DNA no estômago, cólon e bexiga dos animais. Todos estes corantes induziram dano ao DNA no trato digestório, mesmo em dosagem baixa (10 ou 100mg/kg). Entre eles, amaranço, vermelho allura, “*New Coccine*” e tartrazina, induziram dano ao DNA no cólon em doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA). No entanto, em trabalho publicado por Poul et al. (2009), foi avaliado o potencial genotóxico dos corantes amaranço, amarelo crepúsculo e tartrazina no intestino de camundongos por meio do teste do micronúcleo. Este estudo demonstrou que a exposição oral aguda aos corantes em doses até 2000 mg/kg, não induziu efeitos genotóxicos no intestino dos animais. O autor ainda sugere que a genotoxicidade observada por Sasaki et al. (2002) pode ser parcialmente explicada pela citotoxicidade tecido-específica dos corantes analisados.

Dentre os pigmentos naturais, sem dúvida os carotenóides têm sido os mais adicionados em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais. Podem ser obtidos a um baixo custo, por síntese química, a maioria com estrutura idêntica aos naturais, ou por extração a partir de algumas fontes naturais, tais como urucum e tomate. A bixina é o principal carotenóide presente nas sementes de urucum. Preparações deste composto são muito utilizadas na indústria para dar cor a alimentos como salsicha, margarina, salgadinhos e queijo (RIOS; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005).

De acordo com a Resolução - CNNPA nº 44, de 1978, publicado pela ANVISA, “corante orgânico sintético idêntico ao natural - é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural” (ANVISA, 1978). O beta-caroteno sintético, neste sentido, apesar de não ser uma substância de origem

natural, torna-se interessante na indústria de alimentos, pois mantém suas propriedades benéficas devido à sua estrutura química idêntica àquele obtido naturalmente e ainda torna sua produção viável.

Os carotenóides são uma família de pigmentos sintetizados apenas por plantas e microorganismos. Nas plantas, desempenham função no mecanismo fotossintético e na proteção contra o dano causado por exposição à luz. Frutas e vegetais constituem a maior fonte de carotenóides na dieta humana, presentes como microcomponentes e responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha destes alimentos (MANGELS et al., 1993). Acredita-se que os carotenóides são os responsáveis pelas propriedades benéficas de frutas e vegetais na prevenção de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e doenças crônicas (ASTORG et al., 1997; PAIVA; RUSSELL, 1999). Mais de 600 carotenóides têm sido identificados na natureza. No entanto, aproximadamente 40 estão presentes na dieta humana. Destes 40, apenas 20 carotenóides têm sido avaliados em tecidos humanos. E 90% dos carotenóides presentes na dieta e tecidos humanos são representados pelo alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (RAO; RAO, 2007).

Desde o estudo de Peto, Doll e Sporn (1981), mostrando a relação inversa entre o risco de câncer e o consumo de produtos ricos em carotenóides, as pesquisas com beta-caroteno vêm se intensificando. Encontrado principalmente em frutas e vegetais de coloração amarela e verde como cenoura, espinafre, damasco, batata doce, brócolis, pimentas e pêssego (RAO; RAO, 2007; KEIJER et al., 2005), o beta-caroteno tem importante papel na manutenção da saúde, agindo como potente antioxidante e como matéria-prima para produção metabólica de retinol e vitamina A.

Estudos feitos por Foote e Denny (1968), evidenciaram o beta-caroteno como eficiente seqüestrador de oxigênio singlete. O potencial antioxidante do beta-caroteno, bem reconhecido entre outros pigmentos encontrados em vegetais, se deve ao número de ligações duplas

conjugadas presentes na molécula, proporcionando a este composto alta reatividade química (Figura 1).

Figura 1 - Fórmula estrutural do beta-caroteno. Fonte: IUPAC, 1975.

Os carotenóides têm propriedades antioxidantes devido à sua alta capacidade de seqüestrar radicais livres e desativar espécies reativas de oxigênio (EDGE; MCGARVEY; TRUSCOTT, 1997). A desativação do oxigênio singlete ocorre através de processo físico ou químico de transferência de energia (STRATTON; SCHAEFER; LIEBLER, 1993).

A supressão do oxigênio singlete pelo processo físico ocorre através da transferência da energia de excitação do $^1\text{O}_2$ para o carotenóide, resultando em um estado estável do oxigênio e um estado triplete do carotenóide. A energia do carotenóide, então é dissipada entre o meio, através de interações rotacionais e vibracionais, retornando para sua forma estável (Equações 1 e 2). Neste sistema o carotenóide permanece intacto e pode, novamente, inativar outro oxigênio (STAHL; SIES, 1993).

Por outro lado, o processo de desativação química resulta em destruição do cromóforo e na formação de produtos de oxidação (Equação 3) (STRATTON; SCHAEFER; LIEBLER, 1993) com a possibilidade de reações de adição (LIEBLER, 1993; YAMAUCHI et al., 1993).

Após uma completa avaliação da literatura relacionada a carotenóides e câncer, a “*Internacional Agency for Research on Câncer*” (IARC, 1998), concluiu que havia evidências suficientes sobre a eficiência da atividade câncer-preventiva do beta-caroteno em modelos animais experimentais. Esta proteção se deve principalmente à sua característica antioxidante e pró-vitamina A. Além das funções já conhecidas da vitamina A, esta substância também vem sendo objeto de pesquisa em relação a sua ação anti-carcinogênica, devido às suas funções de controle de diferenciação e proliferação celular (ARAB; STECK-SCOTT; BOWEN, 2001).

Algumas pesquisas, no entanto, já mostraram efeito pró-oxidante deste carotenóide. O beta-caroteno, na concentração de 10 μM aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio e as concentrações de glutathione em células humanas leucêmicas e de adenocarcinoma do colón, *in vitro* (PALOZZA et al., 2003). O efeito pró-oxidante do beta-caroteno também foi demonstrado em ratos, que apresentaram aumento da atividade de enzimas de fase I do fígado, como também aumento do estresse oxidativo (PAOLINI et al., 2001).

Vários estudos vêm sendo realizados para analisar a dose diária ideal de beta-caroteno que pode ser administrada para o ser humano. O aumento do interesse nestes estudos é justificado principalmente, pelos resultados de duas grandes pesquisas envolvendo fumantes e trabalhadores de fábricas de asbestos. A primeira delas (*alpha-tocopherol/beta-carotene* - ATBC) foi desenvolvida pelo U.S. *National Cancer Institute*, na Finlândia. Nesta pesquisa uma dose suplementar de 20mg/dia de beta-caroteno foi administrada em 29.133 homens, fumantes, com idade entre 50 e 69 anos, durante 5 a 8 anos. Esta dose, consideravelmente maior do que a quantidade normal ingerida pela população finlandesa, provocou um aumento de 18% na incidência de câncer de pulmão, aumentando em 8% a mortalidade por este tipo de doença (ATBC, 1994). Outro estudo foi intitulado *Carotene and Retinol Efficacy Trial* (CARET),

realizado nos Estados Unidos. Nesta pesquisa foram administrados 30mg/dia de beta-caroteno e 25.000 UI/dia de retinil ester em pessoas fumantes e trabalhadoras de fábricas de asbestos. Foram envolvidas 18.314 pessoas no tratamento que levou 4 anos. Após este período, observou-se um aumento de 28% na incidência de câncer de pulmão e aumento de 17% na mortalidade em comparação ao grupo placebo (OMENN et al., 1996).

Por outro lado, um estudo intitulado “*The Physicians’ Health Study*” feito por Hennekens et al. (1996) com a aplicação de uma dose ainda maior de beta-caroteno (50mg), durante 1982 e 1995, em dias alternados, não mostrou aumento na incidência de câncer entre os pacientes que eram, na maioria, não-fumantes. Adicionalmente, em 1997 foi iniciado o “*The Physicians’ Health Study II*” dando continuidade ao tratamento com beta caroteno dos participantes do primeiro estudo e ainda o recrutamento de mais voluntários. Neste segundo estudo puderam concluir que o tratamento a longo prazo com beta caroteno promoveu benefícios à cognição dos voluntários que fizeram parte do primeiro e do segundo estudo (GRODSTEIN et al., 2007).

Pesquisa conduzida por Zhang e Omaye (2001), mostrou que a atividade antioxidante ou pró-oxidante do beta-caroteno provavelmente está relacionada com sua concentração e a pressão de oxigênio no meio, o que explicaria o aumento na incidência de câncer de pulmão em pessoas fumantes, quando é feita a suplementação com o carotenóide.

Em estudo recente, o beta-caroteno e demais carotenóides, bem como o alfa-tocoferol, selênio e radicais peroxil, foram dosados no plasma de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão. Os casos positivos (258) apresentaram em média um déficit de 17,1% de beta-caroteno no plasma em relação ao grupo controle (515). Esta diferença, considerada significativa pelos autores, corrobora a importância do beta-caroteno na proteção contra o câncer de pulmão (COMSTOCK et al., 2008). Persson et al. (2008) conduziram uma pesquisa semelhante. Os níveis plasmáticos de beta-caroteno, luteína/zeaxantina, licopeno, retinol, e tocoferol foram

avaliados em pacientes com câncer gástrico. Quando comparado ao controle, apenas o beta-caroteno apresentou relação inversa entre sua concentração no plasma e o risco com este tipo de câncer.

Portanto, mais estudos devem ser feitos para analisar a dose efetiva e segura deste importante nutriente, para que haja a promoção da saúde daqueles que se alimentam de produtos que contenham o beta-caroteno como principal corante. Pesquisa realizada por Liu et al. (2000) analisou a diferença entre a suplementação de beta-caroteno em doses fisiológica (0,43 mg/kg/dia) e farmacológica (2,4 mg/kg/dia). O autor ainda considerou estas doses equivalentes a 6 mg e 30 mg/dia em comparação a uma suplementação em humanos. Durante o período de tratamento de 6 meses, os animais ainda foram expostos a fumaça de cigarro. Foram investigados neste estudo os efeitos destas doses quanto à concentração de beta-caroteno e ácido retinóico, expressão de receptores de ácido retinóico, fatores de transcrição (AP-1; c-Jun e c-Fos), ciclina D1, antígeno nuclear de proliferação celular, e mudanças histopatológicas, todos os parâmetros analisados no pulmão dos animais. O autor concluiu que a dose fisiológica não demonstrou efeitos prejudiciais e ainda ofereceu proteção contra danos induzidos pela fumaça de cigarro no pulmão dos animais.

A dose adequada destes corantes em uma dieta regular, portanto pode promover a saúde e qualidade de vida. Porém, a questão que ainda permanece sem resposta é como estes corantes, na dose adequada, podem fornecer o benefício esperado *in vivo* quando consumidos (REDDY; ALEXANDER-LINDO; NAIR, 2005).

Embora não existam trabalhos recentes envolvendo a análise do potencial antimutagênico do beta-caroteno puro, existem estudos que comprovam essa propriedade do carotenóide, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Gleit et al. (2002), pesquisando o efeito protetor do beta-caroteno e licopeno contra danos genotóxicos induzidos pelo antitumoral bleomicina em linfócitos em cultura, concluíram que o beta-caroteno foi capaz de proteger o DNA das células

contra quebras induzidas por este antitumoral, enquanto que o licopeno não teve o mesmo efeito. Belogolovskaya et al. (2000) observaram que a frequência de aberrações cromossômicas, produzidas pela ciclofosfamida, em medula óssea de camundongos, foi reduzida após tratamento com associação de aspartame (0,4 e 4mg/kg) e beta-caroteno (0,15-15mg/kg). Outro estudo foi conduzido por Patel et al. (1998) para tentar avaliar o efeito protetor do beta-caroteno contra a clastogenicidade de “*pan masala*”, uma mistura feita com tabaco e nozes, usada em algumas culturas para mastigação. O uso dessa substância está relacionado com câncer bucal. Foi observado, neste estudo, o potencial anticlastogênico do beta-caroteno na redução da frequência de aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs, em células em cultura de ovário de camundongos.

O potencial tecnológico atual da indústria alimentícia tem permitido o desenvolvimento de nutrientes encapsulados que podem aumentar a qualidade nutricional dos alimentos e aprimorar a forma de liberação de compostos bioativos *in vivo*, melhorando a qualidade de vida dos consumidores (AUGUSTIN; HEMAR, 2009). Avanços são feitos no entendimento de como os efeitos fisiológicos de ingredientes alimentares são afetados pelo processamento industrial e como estes alimentos são digeridos e metabolizados (DE VOS et al., 2006). No entanto, ainda não se tem conhecimento de como as tecnologias utilizadas para melhorar o potencial antioxidante de alimentos poderia ou não contribuir para a promoção da saúde dos consumidores. Com isso, é necessário que se façam estudos das propriedades destes compostos em sistemas biológicos.

1.2 Microencapsulamento de Carotenóides por “*Spray-Dryer*”

A tecnologia de microencapsulamento consiste de um empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas, que liberam o conteúdo

encapsulado em taxas constantes durante prolongado período de tempo (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). As microcápsulas são muito utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica. O uso do microencapsulamento na indústria alimentícia, para proteger, isolar ou controlar a liberação de uma substância, é de grande interesse (SCHROOYEN; VAN DER MEER; DE KRUIF, 2001). Com a técnica é possível a obtenção de compostos na forma de pó estável, dispersível em água e de fácil incorporação aos alimentos.

Dentre as várias técnicas de encapsulamento disponíveis, “*spray-drying*” é uma das mais utilizadas na indústria de alimentos, cosméticos e medicamentos. Wagner e Warthesen (1995) obtiveram maior eficiência no encapsulamento tanto para o alfa- (89%) como para o beta-caroteno (87%) quando foi utilizada maltodextrina 4 como material de parede. Oleoresina de rosa mosqueta contendo elevado teor de carotenóides foi encapsulada por “*spray-dryer*” com temperatura de entrada do ar de $150 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ou $100 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e temperatura de saída do ar de $70 \pm 5^{\circ}\text{C}$ ou $65 \pm 5^{\circ}\text{C}$, com amido ou gelatina como encapsulantes, respectivamente. A perda de *trans*-rubixantina durante o processo de encapsulamento, tanto com matriz de amido quanto de gelatina, foi de 40%. As perdas de *trans*-licopeno e de *trans*-beta-caroteno em gelatina foram de 28 e 1%, respectivamente, enquanto em matriz de amido foram maiores, de 46 e 29% (ROBERT et al., 2003).

Padrão cristalizado de *trans*-beta-caroteno foi encapsulado por Desobry, Netto e Labuza (1997) com 40% de maltodextrina em “*spray-dryer*”, operado com temperaturas de entrada e saída de ar de $170 \pm 5^{\circ}\text{C}$ e $95 \pm 5^{\circ}\text{C}$, respectivamente. A perda de beta-caroteno durante o processo foi de 11% e a eficiência do encapsulamento foi de $62 \pm 2\%$. Em outro estudo, Desobry, Netto e Labuza (1999), utilizando as mesmas condições para o “*spray-dryer*”, compararam o uso da maltodextrina 25 DE com as maltodextrinas 15 DE e 4 DE adicionadas de glicose (9 ou 18%), galactose (9 ou 18%) ou lactose (24 ou 40%) para encapsular beta-caroteno, sendo obtida eficiência de 78% no encapsulamento com a mistura

maltodextrina 4 DE e glicose. Cristais de bixina foram encapsulados com diferentes soluções de polissacarídeos (40% de sólidos) em “*spray-dryer*”, sendo que o encapsulamento atingiu eficiência de 86% e apresentou maior solubilidade em água (BARBOSA; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005).

Recentemente, Calvo e Santa-María (2008) comprovaram que a concentração de licopeno e beta-caroteno de sementes e talos de tomates diminuiu em função do tempo de estocagem, quando armazenados sob luz. Por outro lado, Montenegro et al. (2007) relataram que a adição de licopeno encapsulado por “*spray-dryer*” com goma arábica/sacarose (8:2) foi capaz de reduzir em cerca de 45% a velocidade de degradação das vitaminas A e D do leite estocado sob luz fluorescente. Estes estudos mostram como as técnicas de microencapsulamento poderiam proteger a degradação de nutrientes presentes em alimentos.

No entanto, não há dados na literatura sobre os efeitos de carotenóides microencapsulados sobre as macromoléculas celulares.

1.3 O Antitumoral Doxorrubicina

Para a avaliação do potencial antimutagênico de um composto, é necessária a utilização de um fármaco capaz de induzir danos ao DNA. A doxorrubicina, portanto, é muito utilizada em estudos para a avaliação de genotoxicidade (ANTUNES; TAKAHASHI, 1998; RIBEIRO et al., 2010; FURTADO et al., 2009; SNYDER, 2009; BARCELOS et al., 2009).

A doxorrubicina é um antitumoral da família das antraciclinas, produzida por *Streptomyces peucetius*. Desde sua descoberta na década de 1960 até hoje, as antraciclinas são as drogas mais utilizadas no tratamento de vários tipos de câncer como de ovário, mama, bexiga, tireóide e câncer gástrico. O sucesso no uso da doxorrubicina, entretanto, tem sido limitado devido à sua cardiotoxicidade, cuja manifestação está relacionada com a dose total utilizada do antitumoral (CHRISTIANSEN; AUTSCHBACH, 2006). O mecanismo de ação

das antraciclinas em células tumorais continua sendo motivo de controvérsia. Alguns mecanismos propostos são a intercalação ao DNA, levando à inibição da transcrição; geração de espécies reativas de oxigênio, provocando dano ao DNA ou peroxidação lipídica; formação de ligações cruzadas na cadeia do DNA; interferência com a abertura e separação das cadeias do DNA através de ação sobre a helicase; efeitos diretos na membrana celular; dano ao DNA e indução de apoptose através da inibição da topoisomerase II (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007). Contudo, a atividade sobre a enzima topoisomerase II ainda é considerada como a principal ação antitumoral da doxorrubicina (LIU, 1989; INJAC; STRUKELJ, 2008). Estudo conduzido por Tewey et al. (1984), demonstrou que a inibição da topoisomerase II pela doxorrubicina, pode ser resultante da estabilização do complexo de clivagem e por meio da intercalação ao DNA. A intercalação poderia bloquear o sítio de ligação da topoisomerase II ao DNA comprometendo sua função, haja vista que em altas concentrações de drogas intercalantes, a clivagem do DNA foi inibida. Portanto a doxorrubicina funciona como “veneno” para esta enzima, interrompendo sua função normal e induzindo danos ao DNA (INJAC; STRUKELJ, 2008).

Embora haja conhecimento que as espécies reativas de oxigênio não sejam a principal via de ação antitumoral da doxorrubicina (TEWEY et al., 1984), a formação destas substâncias também afeta a estabilidade do DNA. Os radicais livres produzidos pela doxorrubicina provêm de um sistema não-enzimático que envolve reações com o ferro. O Fe^{3+} reage com a doxorrubicina em uma reação redox, que recebe um elétron e um complexo radical Fe^{2+} -doxorrubicina é produzido (DE BEER; BOTTONE; VOEST, 2001). Este complexo ferro-doxorrubicina pode reduzir oxigênio a peróxido de hidrogênio e formar outras espécies reativas de oxigênio (GIANNI et al., 1985). Quando estes radicais são formados, podem se ligar ao DNA e provocar quebras das fitas (ELIOT; GIANNI; MYERS, 1984).

Devido à grande importância da doxorubicina na terapia do câncer, pesquisas têm sido direcionadas ao desenvolvimento de mecanismos para prevenir ou atenuar os efeitos citotóxicos do antitumoral. A produção de espécies reativas de oxigênio, como produtos do metabolismo da doxorubicina, é considerado o principal efeito tóxico do medicamento, o que intensifica a busca por substâncias antioxidantes como os carotenóides, flavonóides, polifenóis, selênio e as vitaminas E, C e A (QUILES et al., 2002).

O potencial protetor de compostos sobre os danos induzidos pela doxorubicina, portanto, podem ser avaliados por meio de ensaios de mutagenicidade.

1.4 Ensaios de Mutagenicidade

Para se conhecer o potencial mutagênico e antimutagênico de um determinado composto, existem testes de mutagenicidade bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências regulatórias como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial. A nova edição do “*Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*”, publicada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, aponta as alterações na expressão gênica, reparo do DNA, controle do ciclo celular, instabilidade genômica e danos cromossômicos como as principais consequências da exposição aos agentes ambientais e eventos críticos envolvidos no processo de carcinogênese (PRESTON, 2007). Esta preocupação com a identificação de fatores envolvidos na etiologia do câncer também inclui o papel da dieta e dos compostos bioativos dos alimentos, tais como os carotenóides. Dentre as metodologias, merecem destaque o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa *in vivo*.

1.4.1 Teste do Micronúcleo

A maioria das investigações toxicológicas envolvendo carotenóides e o beta-caroteno, tem sido direcionadas para as propriedades antimutagênicas destes compostos (ALIJA et al., 2004). Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos que resultam de quebras ou cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase, e podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a divisão nuclear. O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina dos testes de genética toxicológica dos agentes químicos e radiações *in vivo* e *in vitro*. Os micronúcleos podem ser analisados em eritrócitos, células da mucosa oral ou linfócitos para a estimativa do dano genético induzido *in vivo* (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE, 1983).

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (HAYASHI; SOFUNI; MORITA, 1991; HAYASHI et al., 2007; TWEATS et al., 2007). Por este parâmetro pode-se avaliar a capacidade de substâncias para induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico em células em divisão na medula óssea.

Na medula óssea, durante o processo de divisão celular, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos diferenciando-se em eritrócitos policromáticos (Figura 2). Estes são eritrócitos jovens, ricos em ribossomos e, por isso, são facilmente corados, diferenciando-se dos eritrócitos maduros ou normocromáticos que não contêm ribossomos. Na presença de agentes clastogênicos e de agentes aneugênicos, os fragmentos cromossômicos resultantes de quebras do material genético podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose, originando o micronúcleo. Este, por sua vez, permanece no citoplasma e pode ser facilmente visualizado em eritrócitos policromáticos.

Considerando-se que o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, qualquer micronúcleo que ele contenha tem grande probabilidade de ter sido gerado como aberrações cromossômicas induzidas recentemente, na presença da substância que causou este dano (SCHMID, 1976).

Figura 2 - Processo de eritropoiese *in vivo*. Mecanismo de formação de eritrócitos policromáticos, normocromáticos e micronúcleos. N: núcleo. PCE: eritrócito policromático. NCE: eritrócito normocromático. MNPCE: eritrócito policromático micronucleado. Fonte: Adaptado de Krishna e Hayashi (2000).

Considerando-se que reticulócitos são células eritrocitárias imaturas, o teste do micronúcleo também é realizado em reticulócitos de sangue periférico de roedores tratados com agentes mutagênicos. Simultaneamente, realiza-se a técnica convencional do micronúcleo com células da medula óssea para a comparação dos resultados. Estudos já demonstraram a presença de micronúcleos em sangue periférico, confirmando que os reticulócitos presentes neste tecido também podem ser utilizados como células-alvo para o teste do micronúcleo com resultados confiáveis em roedores (HAYASHI; SOFUNI; MORITA, 1991; HAYASHI et al., 2007).

1.4.2 Ensaio do Cometa

Denominado de eletroforese de célula única (“*Single cell electrophoresis test*”) ou ensaio do cometa, esta metodologia foi descrita por Singh et al. (1988) e modificada por Speit e Hartman (1999). No protocolo descrito por Speit e Hartman (1999), para a realização deste ensaio, retira-se células sanguíneas de um animal tratado com a substância em análise e este sangue é misturado com agarose de baixo ponto de fusão. Quando a agarose é solidificada, as células sofrem lise em uma solução detergente por pelo menos uma hora, e então as lâminas são colocadas em câmara de eletroforese com solução alcalina, permitindo o desenrolar do DNA. Quando o composto em análise provoca alguma modificação no material genético, este procedimento resulta na migração de pequenos fragmentos do DNA através do gel de agarose, após a eletroforese. Assim, caracteriza-se a imagem de nucleóides como cometas, com cabeça e cauda, que quando corados podem ser observados em microscópio de fluorescência.

Um dos métodos propostos para avaliação de danos é através da imagem obtida por fotomicrografia e posterior análise por *software* específico. Outro método válido para avaliação é o escore visual, no qual os danos ao DNA são classificados em quatro categorias, distribuídos desde a classe zero, na qual as células não apresentam cauda (dano mínimo), até a classe três, na qual as células apresentam o tamanho da cauda superior a duas vezes o tamanho da cabeça (dano máximo) (TICE et al., 2000).

O ensaio do cometa é um ensaio de genética toxicológica usado para se avaliar a genotoxicidade de um composto. É ainda descrito como um teste rápido, simples na execução, não requer grande quantidade de amostra da substância teste, pode ser aplicado em diferentes tecidos dos quais se obtêm suspensões de determinadas células, é acessível financeiramente além de ser considerado um ensaio de alta sensibilidade e especificidade. O ensaio do cometa permite a detecção de lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de

correção (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1997). Este ensaio foi empregado para a investigação do potencial antioxidante e antígeno-tóxico das vitaminas E, C, A e seus análogos no fígado de roedores nos quais foi induzida a hepatocarcinogênese pelo agente químico dimetilaminoazobenzeno (VELANGANNI et al., 2007).

Portanto, a dieta e os hábitos alimentares podem aumentar o risco do câncer, devido ao consumo de compostos mutagênicos encontrados nos alimentos. Estes alimentos podem aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio no organismo. Estas substâncias podem agir no núcleo da célula provocando mutações, alterando o funcionamento normal da célula, proporcionando o desenvolvimento do câncer. Por outro lado, existe um grande número de compostos bioativos nos alimentos identificados como antimutagênicos (FENECH, 2005). Estudos em animais têm mostrado o potencial antimutagênico dos carotenóides da dieta e sua capacidade de sequestrar os radicais livres. Existem poucos trabalhos na literatura sobre a modulação dos pigmentos e extratos encontrados na dieta sobre a indução de danos cromossômicos e possíveis efeitos antimutagênicos e antioxidantes (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). A dieta contém, portanto, compostos bioativos que devem ser testados e estes ensaios biológicos poderão ser realizados tanto com os pigmentos que já são conhecidos, como com aqueles identificados em vegetais ou sintetizados, antes do amplo uso destes pigmentos e extratos nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.

CONCLUSÕES

Foi realizada, neste estudo, a comparação da ação mutagênica/antimutagênica entre duas doses do beta-caroteno puro ou na forma microencapsulada em células da medula óssea, rins, fígado e reticulócitos de ratos Wistar tratados com o antitumoral doxorrubicina.

Conforme os resultados obtidos com o teste do micronúcleo, pode-se concluir que:

- A dose de 2,5mg/kg do beta-caroteno puro não foi mutagênica, pois não induziu a formação de micronúcleos;
- A dose de 5mg/kg do beta-caroteno puro foi mutagênica, pois induziu a formação de micronúcleos;
- Quando associados à doxorrubicina, o beta-caroteno puro foi capaz de proteger contra a mutagenicidade da doxorrubicina apenas na dose 2,5mg/kg;
- As duas doses do beta-caroteno microencapsulado não foram mutagênicas nem antimutagênicas;

Conforme os resultados obtidos com o ensaio do cometa, pode-se concluir que:

- As duas doses, tanto do beta-caroteno puro quanto do microencapsulado, no fígado e nos rins, não foram genotóxicas;
 - No tratamento com o beta-caroteno puro, associado à doxorrubicina, houve redução na formação de micronúcleos, no fígado e nos rins, porém esta proteção não pode ser atribuída exclusivamente ao beta-caroteno puro, pois a redução dos danos foi semelhante ao tratamento com o Controle Solvente (óleo de milho);
 - No tratamento com o beta-caroteno microencapsulado, associado a doxorrubicina, as duas doses foram antigenotóxicas no fígado, enquanto nos
-

rins apenas a dose 5mg/kg foi considerada antigenotóxica.

- Na comparação entre os resultados obtidos com o teste o micronúcleo e ensaio do cometa, foi possível concluir que apesar dos danos observados no ensaio do cometa serem passíveis de reparo, alguns danos podem não ser reparados, dependendo do tratamento, levando à formação de micronúcleos.

Em conclusão, o beta-caroteno puro não deve ser utilizado em altas doses, pois aumenta o dano ao DNA e quando microencapsulado não perde suas propriedades, porém uma dose maior deve ser utilizada para que o carotenóide tenha efeito antimutagênico.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLAH, A.R.; AL-MAJED, A.A.; MOSTAFA, A.M.; AL-SHABANAH, O.A.; DIN, A.G.; NAGI, M.N. Protective effect of arabic gum against cardiotoxicity induced by doxorubicin in mice: a possible mechanism of protection. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, New York, v.16 n.5, p.254-259, 2002.

ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; ZETTERBERG, G.; BERGQVIST, M.; GRAWÉ, J. Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.36, n.1, p.22-31, 2000.

ALI, B.H. Does gum Arabic have an antioxidant action in rat kidney? **Renal failure**, New York, v.26, n.1, p.1-3, 2004.

ALI, B.H.; AL MOUNDHRI, M.S. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. **Food and chemical toxicology**, New York, v.44, n.8, p.1173-1183, 2006.

ALIJA, A.J.; BRESGEN, N.; SOMMERBURG, O.; SIEMS, W.; ECKL, P.M. Cytotoxic and genotoxic effects of beta-carotene breakdown products on primary rat hepatocytes. **Carcinogenesis**, New York, v.25, n.5, p.827-831, 2004.

AL-MAJED, A.A.; ABD-ALLAH, A.R.; AL-RIKABI, A.C.; AL-SHABANAH, O.A.; MOSTAFA, A.M. Effect of oral administration of Arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, New York, v.17, n.3, p.146-153, 2003.

AL-MAJED, A.A.; MOSTAFA, A.M.; AL-RIKABI, A.C.; AL-SHABANAH, O.A. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacological research**, London, v.46, n.5, p.445-451, 2002.

ANTUNES, L.M.; DARIN, J.D.; BIANCHI, M.D. Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. **Pharmacological research**, London, v.41, n.4, p.405-411, 2000.

ANTUNES, L.M.; TAKAHASHI, C.S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation research**, Amsterdam, v.419, p.1-3, p.137-143, 1998.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.2, p.81-88, 2000.

ANTUNES, L.M.G.; PASCOAL, L.M.; BIANCHI, M.L.P.; DIAS, F.L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation research**, Amsterdam, v.585, p.113-119, 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 44 de 1977. Considera corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento(e bebida). D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 01 de fevereiro de 1978.

APARECIDA RESENDE, F.; DE ANDRADE BARCALA, C.A.; DA SILVA FARIA, M.C.; KATO, F.H.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life sciences**, Elmsford, v.79, n.13, p.1268-1273, 2006.

ARAB, L.; STECK-SCOTT, S.; BOWEN, P. Participation of lycopene and beta-carotene in carcinogenesis: defenders, aggressors, or passive bystanders? **Epidemiologic reviews**, Baltimore, v.23, n.2, p.211-230, 2001.

ASTORG, P.; GRADELET, S.; BERGÈS, R.; SUSCHETET, M. Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. **Nutrition and câncer**, Philadelphia, v.29, n.1, p.60-68, 1997.

ATBC - The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. **The New England journal of medicine**, Boston, v.330, p.1029-1035, 1994.

AUGUSTIN, M.A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society reviews**, London, v. 38, n.4, p.902-912, 2009.

BALSANO, C.; ALISI, A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. Current pharmaceutical design, Schiphol, v.15, n.26, p.3063-3073, 2009.

BARBOSA, M.I.J.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Light stability of spray-dried encapsulated bixin with different edible polysaccharides preparations. **Food research international**, Ottawa, v.38, p.989-994, 2005.

BARCELOS, G.R.; ANGELI, J.P.; SERPELONI, J.M.; ROCHA, B.A.; MANTOVANI, M.S.; ANTUNES, L.M. Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.50, n.9, p.808-814, 2009.

BELOGOLOVSKAYA, E.G.; ORESHCHENKO, A.V.; DURNEV, A.D.; SEREDENIN, S.B.; LITVINOVA, E.V.; ZUBTSOV, Y.N. Effects of beta-carotene and aspartame on clustogenic activity of cyclophosphamide and dioxidine in mice. **Bulletin of experimental biology and medicine**, New York, v.130, n.11, p.1102-1205, 2000.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RDC Nº 41, DE 10 DE AGOSTO DE 2009. "Regulamento Técnico sobre Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Subcategoria 16.1.1 Bebidas Alcoólicas". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 ago. 2009. Seção 1, p. 39.

BRENDLER-SCHWAAB, S.; HARTMANN, A.; PFUHLER, S.; SPEIT, G. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, Oxford, v.20, n.4, p.245-254, 2005.

BURLINSON, B.; TICE, R.R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S.Y.; COLLINS, A.R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T.S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y.F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. *In vivo* Comet Assay Workgroup, part of the Fourth International Workgroup on Genotoxicity Testing. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the *in vivo* Comet assay workgroup, **Mutation research**, Amsterdam, v.627, p.31-35, 2007.

BUTTON, M.; JENKIN, G.R.; BOWMAN, K.J.; HARRINGTON, C.F.; BREWER, T.S.; JONES, G.D.; WATTS, M.J. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the Comet assay. **Mutation research**, Amsterdam, 2009. In Press. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.009>. Acesso em 14/01/2010.

CALABRESE, V.; BATES, T.E.; MANCUSO, C.; CORNELIUS, C.; VENTIMIGLIA, B.; CAMBRIA, M.T.; DI RENZO, L.; DE LORENZO, A.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T. Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. **Molecular nutrition & food research**, Weinheim, v.52, n.9, p.1062-1073, 2008.

CALVO, M.M.; SANTA-MARÍA, G. Effect of illumination and chlorophylls on stability of tomato carotenoids, **Food chemistry**, Barking, v.107, p.1365–1370, 2008.

CASARETT & DOULL'S. Toxicology, the Basic Science of Poisons. 7h ed. Chapter 2. Principles of Toxicology, C. D. Klaassen Ed. McGraw-Hill, p.18, 2008.

CEDERBERG, H.; HENRIKSSON, J.; BINDERUP, M.L. DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. **Mutagenesis**, Washington, 2009. In Press. Disponível em <<http://mutage.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gep051v1>>. Acesso em 14/01/2010.

CELIK, A.; OGENLER, O.; CÖMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, Washington, v.20, n.6, p.411-415, 2005.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current opinion in biotechnology**, London, v.18, n.2, p.184-190, 2007.

CHRISTIANSEN, S.; AUTSCHBACH, R. Doxorubicin in experimental and clinical heart failure. **European journal of cardio-thoracic surgery**, Berlin, v.30, p.611-616, 2006.

CIACCIO, M.; VALENZA, M.; TESORIERE, L.; BONGIORNO, A.; ALBIERO, R.; LIVREA, M.A. Vitamin A inhibits doxorubicin-induced membrane lipid peroxidation in rat tissues *in vivo*. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v.302, n.1, p.103-108, 1993.

COMSTOCK, G.W; ALBERG, A.J; HUANG, H.Y.; WU, K.; BURKE, A.E.; HOFFMAN, S.C.; NORKUS, E.P.; GROSS, M.; CUTLER, R.G.; MORRIS, J.S.; SPATE, V.L.; HELZLSOUER, K.J. The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: ascorbic acids, carotenoids, alpha-tocopherol, selenium, and total peroxyl radical absorbing capacity. **American journal of epidemiology**, Baltimore, v.168, n.7, p.831-840, 2008.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: Chemistry and biochemistry of plant pigments, vol.2. T.W. Goodwin (Ed.). **Academic press**, London, p.38-165, 1976.

DE BEER, E.L.; BOTTONE, A.E.; VOEST, E.E. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v.415, n.1, p.1-11, 2001.

DE JONGE, M.J.; VERWEIJ, J. Renal toxicities of chemotherapy. **Seminars in oncology**, Philadelphia, v.33, n.1, p.68-73, 2006.

DE VOS, W.M. ; CASTENMILLER, J.J. ; HAMER, R.J. ; BRUMMER, R.J. Nutridynamics-studying the dynamics of food components in products and in the consumer. **Current opinion in biotechnology**, London, v.17, n.2, p.217-225, 2006.

DECKER, E.A.; WARNER, K.; RICHARDS, M.P.; SHAHIDI, F. Measuring antioxidant effectiveness in food. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.53, p.4303-4310, 2005.

DELMANTO, R.D.; DE LIMA, P.L.; SUGUI, M.M.; DA EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the

genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation research**, Amsterdam, v.496, n1-2, p.15-21, 2001.

DERTINGER, S.D.; CHEN, Y.; MILLER, R.K.; BREWER, K.J.; SMUDZIN, T.; TOROUS, D.K.; HALL, N.E.; OLVANY, K.A.; MURANTE, F.G.; TOMETSKO, C.R. Micronucleated CD71-positive reticulocytes: a blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans. **Mutation research**, Amsterdam, v.542, n.1-2, p.77-87, 2003.

DESOBRY, S.A; NETTO, F.M.; LABUZA, T.P.; Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for β -carotene encapsulation and preservation. **Journal of food science**, Champaign, v.62, n.6, p.1158–1162, 1997.

DESOBRY, S.A.; NETTO, F.M.; LABUZA, T.P. Influence of Maltodextrin Systems at an Equivalent 25DE on Encapsulated β -carotene Loss During Storage. **Journal of food processing preservation**, Malden, v.23, p.39-55, 1999.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell biology and toxicology**, Princeton, v.25, n.1, p.5-32, 2009.

DMITRIEVA, N.I.; CAI, Q.; BURG, M.B. Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, n.8, p.2317-2322, 2004.

DURNEV, A.D.; TIURINA, L.S.; GUSEVA, N.V.; ORESHCHENKO, A.V.; SEREDENIN, S.B. Mutagen-modifying effects of beta-carotene *in vivo*. **Genetika**, Moskva, v.33(5), p.717-720, 1997.

EDGE, R.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. The carotenoids as anti-oxidants--a review. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, Lausanne, v.41, n.3, p.189-200, 1997.

ELIOT, H.; GIANNI, L.; MYERS, C. Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. **Biochemistry**, Washington, v.23, p.928-936, 1984.

EVANGELISTA, C.M.; ANTUNES, L.M.; FRANCESCATO, H.D.; BIANCHI, M.L. Effects of the olive, extra virgin olive and canola oils on cisplatin-induced clastogenesis in Wistar rats. **Food and chemical toxicology**, New York, v.42, n.8, p.1291-1297, 2004.

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme. Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Action Required as a Result of Changes in Acceptable Daily Intake (ADI)

Status and Other Toxicological Recommendations. Rotterdam, The Netherlands, 11-15 March 2002.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods in molecular medicine**, Totowa, v.111, p.3-32, 2005.

FERREIRA, A.L.; SALVADORI, D.M.F.; NASCIMENTO, M.C.; ROCHA, N.S.; CORREA, C.R.; PEREIRA, E.J.; MATSUBARA, L.S.; MATSUBARA, B.B.; LADEIRA, M.S. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. **Mutation research**, Amsterdam, v.631, n.1, p.26-35, 2007.

FOOTE, C.S.; DENNY, R.W. Chemistry of singlet oxygen VII. Quenching by β -carotene. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.90, p.6233-6235, 1968.

FURTADO, R.A.; DE ARAÚJO, F.R.; RESENDE, F.A.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of applied toxicology**, Philadelphia, 2009. Disponível em <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122652792/PDFSTART>. Acesso em 14/01/2010.

GAMAL EL-DIN, A.M.; MOSTAFA, A.M.; AL-SHABANAH, O.A.; AL-BEKAIRI, A.M.; NAGI, M.N. Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Pharmacological research**, London, v.48, n.6, p.631-635, 2003.

GIANNI, L.; ZWEIER, J.L.; LEVY, A.; MYERS, C.E. Characterization of the cycle of iron-mediated electron transfer from Adriamycin to molecular oxygen. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.260, n.11, p.6820-6, 1985.

GLEI, M.; LIEGIBEL, U.M.; EBERT, M.N.; BÖHM, V.; POOL-ZOBEL, B.L. Beta-Carotene reduces bleomycin-induced genetic damage in human lymphocytes. **Toxicology and applied pharmacology**, New York, v.179, n.2, p.65-73, 2002.

GOLLAPUDI, B.B.; MCFADDEN, L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v.347, n.2, p.97-99, 1995.

GRODSTEIN, F.; KANG, J.H.; GLYNN, R.J.; COOK, N.R.; GAZIANO, J.M. A randomized trial of beta carotene supplementation and cognitive function in men: the Physicians' Health Study II. **Archives of internal medicine**, Chicago, v.167, n.20, p.2184-2190, 2007.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. **National Academy Press**.

Washington, 1996. Disponível em http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140&page=R1. Acesso em 14/01/2010.

HAMADA, S.; YAMASAKI, K.I.; NAKANISHI, S.; OMORI, T.; SERIKAWA, T.; HAYASHI, M. Evaluation of the general suitability of the rat for the micronucleus assay: the effect of cyclophosphamide in 14 strains. **Mutation research**, Amsterdam, v.495, n.1-2, p.127-134, 2001.

HANSEN, S.H.; OLSEN, A.K.; SØDERLUND, E.J.; BRUNBORG, G. In vitro investigations of glycidamide-induced DNA lesions in mouse male germ cells and in mouse and human lymphocytes. **Mutation research**, Amsterdam, 2009. In Press. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.012>. Acesso em 14/01/2010.

HARTMANN, A.; AGURELL, E.; BEEVERS, C.; BRENDLER-SCHWAAB, S.; BURLINSON, B.; CLAY, P.; COLLINS, A.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THYBAUD, V.; TICE, R.R. 4th International Comet Assay Workshop. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. 4th International Comet Assay Workshop. **Mutagenesis**, Washington, v.18, n.1, p.45-51, 2003.

HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; AWOGLI, T.; SUZUKI, T.; ASITA, A.O.; SOFUNI, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation research**, Amsterdam, v.278, n.2-3, p.209-213, 1992.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; BLAKEY, D.H.; DERTINGER, S.D.; ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; ASANO, N.; SUZUKI, H.; OHYAMA, W.; GIBSON, D. In Vivo Micronucleus Assay Working Group, IWGT. In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation research**, Amsterdam, v.627, n.1, p.10-30, 2007.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M.JR. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation research**, Amsterdam, v.245, n.4, p.245-259, 1990.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. JR. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v.120, n.4, p.241-247, 1983.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; MORITA, T. Simulation study of the effects of multiple treatments in the mouse bone marrow micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v.252, n.3, p.281-287, 1991.

HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.; ROSNER, B.; COOK, N. E.; BELANGER, C.; LAMOTTE, F.; GAZIANO, J. M. RIDKER, P. M.; WILLETT, W.; PETO, R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.334, p.1145–1149, 1996.

HIGASHIMOTO, M.; ISOYAMA, N.; ISHIBASHI, S.; INOUE, M.; TAKIGUCHI, M.; SUZUKI, S.; OHNISHI, Y.; SATO, M. Tissue-dependent preventive effect of metallothionein against DNA damage in dyslipidemic mice under repeated stresses of fasting or restraint. **Life sciences**, Elmsford, v.84, n.17-18, p.569-575, 2009.

INJAC, R.; BOSKOVIC, M.; PERSE, M.; KOPRIVEC-FURLAN, E.; CERAR, A.; DJORDJEVIC, A.; STRUKELJ, B. Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullerol C60(OH)₂₄ via suppression of oxidative stress. **Pharmacological reports: PR.**, Kraków, v.60, n.5, p.742-749, 2008.

INJAC, R.; STRUKELJ, B. Recent advances in protection against doxorubicin-induced toxicity. **Technology in cancer research & treatment**, Schenectady, v.7, n.6, 497-516, 2008.

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). IARC handbooks of cancer prevention: carotenoids. Vol 2. **Oxford, United Kingdom: Oxford University Press**, 1998:39.

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of Carotenoids. Molecular and Cellular Biochemistry. Volume 9, Number 2 / November, 1975.

KEIJER, J.; BUNSCHOTEN, A.; PALOU, A.; FRANSSEN-VAN HAL, N.L. Beta-carotene and the application of transcriptomics in risk-benefit evaluation of natural dietary components. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.30;1740(2) p.139-146, 2005.

KIM, M.Y.; CHEONG, S.H.; KIM, M.H.; SON, C.; YOOK, H.S.; SOK, D.E.; KIM, J.H.; CHO, Y.; CHUN, H.; KIM, M.R. Leafy vegetable mix supplementation improves lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high fat and high cholesterol diet. **Journal of medicinal food**, Larchmont, v.12, n.4, p.877-84, 2009.

KIRKLAND, D.; AARDEMA, M.; HENDERSON, L, MÜLLER, L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. **Mutation research**, Amsterdam, v.584, n.1-2, p.1-256, 2005.

KIRKLAND, D.; PFUHLER, S.; TWEATS, D.; AARDEMA, M.; CORVI, R.; DARROUDI, F.; ELHAJOUJI, A.; GLATT, H.; HASTWELL, P.; HAYASHI, M.; KASPER, P.; KIRCHNER, S.; LYNCH, A.; MARZIN, D.; MAURICI, D.; MEUNIER, J.R.; MÜLLER, L.

NOHYNEK, G.; PARRY, J.; PARRY, E.; THYBAUD, V.; TICE, R.; VAN BENTHEM, J.; VANPARYS, P.; WHITE, P. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. **Mutation research**, Amsterdam, v.628, n.1, p.31-55, 2007.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation research**, Amsterdam, v.455, n.1-2, p.155-166, 2000.

KUMAR, P.; KALONIA, H.; KUMAR, A. Lycopene modulates nitric oxide pathways against 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. **Life sciences**, Elmsford, v.85, n.19-20, p.711-718, 2009.

KUPPAN, G.; BALASUBRAMANYAM, J.; MONICKARAJ, F.; SRINIVASAN, G.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. **Cytokine**, San Diego, 2009. In Press. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2009.11.003>. Acesso em 14/01/2010.

LAMBERT, J.M.; WEINBRECK, F.; KLEEREBEZEM, M. In vitro analysis of protection of the enzyme bile salt hydrolase against enteric conditions by whey protein-gum arabic microencapsulation. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.56, n.18, p.8360-8364, 2008.

LEO, M.A.; LIEBER, C.S. Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.69, n.6, p.1071-1085, 1999.

LIEBLER, D.C. Antioxidant reactions of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.691, p.20-31, 1993.

LINGYUN, C.; GABRIEL, E.R.; MURIEL, S. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n.5, p. 272-283, 2006.

LIU, C.; WANG, X.D.; BRONSON, R.T.; SMITH, D.E.; KRINSKY, N.I.; RUSSELL, R.M. Effects of physiological versus pharmacological beta-carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette smoke-exposed ferrets. **Carcinogenesis**, New York, v.21, n.12, p.:2245-2253, 2000.

LIU, L.F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v.58, p.351-75, 1989.

LOU, J.; ZHOU, G.; CHU, G.; JIANG, J.; HUANG, F.; ZHENG, S.; LU, Y.; LI, X.; HE, J. Studying the cyto-genotoxic effects of 12 cigarette smoke condensates on human

lymphoblastoid cell line in vitro. **Mutation research**, Amsterdam, 2009. In Press. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.011>. Acesso em 14/01/2010.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TICE, R.R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation research**, Amsterdam, v.189, n.2, p.103-12, 1987.

MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; GOULD, D.H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. **Environmental Mutagenesis**, New York, v.2, n.4, p.509-514, 1980.

MANCA, D.; ROVAGLIO, M. Modeling the controlled release of microencapsulated drugs: theory and experimental validation. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 58, v.7, p. 1337-1351, 2003.

MANGELS, A.R.; HOLDEN, J.M.; BEECHER, G.R.; FORMAN, M.R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.93, n.3, p.284-296, 1993.

MAPARI, S.A.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.57, n.14, p.6253-6261, 2009.

MAYNE, S.T.; HANDELMAN, G.J.; BEECHER, G. Beta-Carotene and lung cancer promotion in heavy smokers--a plausible relationship? **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.88, n.21, p.1513-1515, 1996.

MEDOLA, J.F.; CINTRA, V.P.; PESQUEIRA, E. SILVA E.P.; DE ANDRADE, ROYO V.; DA SILVA, R.; SARAIVA, J.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, E. SILVA M.L.; TAVARES, D.C. (-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. **Food and chemical toxicology**, New York, v.45, n.4, p.638-642, 2007.

MENG, Z.; QIN, G.; ZHANG, B. DNA damage in mice treated with sulfur dioxide by inhalation. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.46, n.3, p.150-155. 2005.

MONTENEGRO, M.A.; NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z.; BORSARELLI, C.D. Photoprotection of Vitamins in Skimmed Milk by an Aqueous Soluble Lycopene-Gum Arabic Microcapsule. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.55, n.2, p.323-329, 2007.

MONTILLA, P.L.; TÚNEZ, I.F.; MUÑOZ, DE AGUEDA. C.; GASCÓN, F.L.; SORIA, J.V. Protective role of melatonin and retinol palmitate in oxidative stress and hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin in rats. **Journal of Pineal Research**, New York, v.25, n.2, p.86-93, 1998.

MUKHERJEE, A.; AGARWAL, K.; AGUILAR, M.A.; SHARMA, A. Anticlastogenic activity of beta-carotene against cyclophosphamide in mice *in vivo*. **Mutation research**, Amsterdam, v.263(1), p.41-46, 1991.

NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.50, p.893-900, 2007.

OBERMUELLER-JEVIC, U.C.; ESPIRITU, I.; CORBACHO, A.M.; CROSS, C.E.; WITSCHI, H. Lung tumor development in mice exposed to tobacco smoke and fed beta-carotene diets. **Toxicological Sciences**, Orlando, v.69(1), p.23-29, 2002.

OMENN, G.S.; GOODMAN, G.E.; THORNQUIST, M.D.; BALMES, J.; CULLEN, M.R., GLASS, A.; KEOGH, J.P.; MEYSKENS, F.L.; VALANIS, B.; WILLIAMS, J.H.; BARNHART, S.; HAMMAR, S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **The New England journal of medicine**, Boston, v.334, n.18, p.1150-1155, 1996.

OSHIDA, K.; IWANAGA, E.; MIYAMOTO-KURAMITSU, K.; MIYAMOTO, Y. An *in vivo* comet assay of multiple organs (liver, kidney and bone marrow) in mice treated with methyl methanesulfonate and acetaminophen accompanied by hematology and/or blood chemistry. **The Journal of toxicological sciences**, Sapporo, v.33, n.5, p.515-524, 2008.

PAIVA, S.A.; RUSSELL, R.M. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v.18, p.5, p.426-433, 1999.

PALOZZA, P.; SERINI, S.; TORSELLO, A.; DI NICUOLO, F.; PICCIONI, E.; UBALDI, V.; PIOLI, C.; WOLF, F.I.; CALVIELLO, G. Beta-carotene regulates NF-kappaB DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. **The Journal of nutrition**, Philadelphia, v.133, n.2, p.381-388, 2003.

PAOLINI, M.; ANTELLI, A.; POZZETTI, L.; SPETLOVA, D.; PEROCCO, P.; VALGIMIGLI, L.; PEDULLI, G.F.; CANTELLI-FORTI, G. Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats. **Carcinogenesis**, New York, v.22, n.9, p.1483-1495, 2001.

PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of food science**, Champaign, v.72, n.2, p.R21-32, 2007.

PATEL, R.K.; TRIVEDI, A.H.; JAJU, R.J.; KUKRETI, M.S.; BHATAVDEKAR, J.M.; SHAH, P.M.; PATEL, D.D. Protection from pan masala induced genomic damage by beta-carotene and retinoic acid--an in vitro experience. **Neoplasma**, Bratislava, v.45, n.3, p.169-175, 1998.

PATEL, S.; PANDEY, A.K.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. **Mutation research**, Amsterdam, v.607, n.2, p.176-183, 2006.

PEREVERZEVA, E.; TRESCHALIN, I.; BODYAGIN, D.; MAKSIMENKO, O.; KREUTER, J.; GELPERINA, S. Intravenous tolerance of a nanoparticle-based formulation of doxorubicin in healthy rats. **Toxicology letters**, Amsterdam, v.178, n.1, p.9-19, 2008.

PERSSON, C.; SASAZUKI, S.; INOUE, M.; KURAHASHI, N.; IWASAKI, M.; MIURA, T.; YE, W.; TSUGANE, S.; JPHC STUDY GROUP. Plasma levels of carotenoids, retinol and tocopherol and the risk of gastric cancer in Japan: a nested case-control study. **Carcinogenesis**, New York, v.29, n.5, p.1042-1048, 2008

PETO, R.; DOLL, R.; SPORN, M.B. Can dietary β -carotene materially reduce human cancer rates?, **Nature**, London, v.290, p.201-208, 1981.

PFUHLER, S.; KIRKLAND, D.; KASPER, P.; HAYASHI, M.; VANPARYS, P.; CARMICHAEL, P.; DERTINGER, S.; EASTMOND, D.; ELHAJOUJI, A.; KRUL, C.; ROTHFUSS, A.; SCHOENING, G.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THOMAS, C.; VAN BENTHEM, J.; CORVI, R. Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities-Report from an ECVAM workshop. **Mutation research**, Amsterdam, v.680, n.1-2, p.31-42, 2009.

POUL, M.; JARRY, G.; ELHKIM, M.O.; POUL, J.M. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v.47, n.2, p.443-448, 2009.

PRESTON, J.R. Epigenetic processes and cancer risk assessment. **Mutation research**, Amsterdam, v.616, n.1-2, p.7-10, 2007.

QUILES, J.L.; HUERTAS, J.R.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; RAMÍREZ-TORTOSA, M.C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, Amsterdam, v.180, n.1, p.79-95, 2002.

RANDHAWA, S.; BAHNA, S.L. Hypersensitivity reactions to food additives. Current opinion in allergy and clinical immunology, Hagerstown, v.9, n.3, p.278-283, 2009.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological research**, London, v.55(3), p.207-217, 2007.

RAUSCHER, R.; EDENHARDER, R.; PLATT, K.L. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. **Mutation research**, Amsterdam, v.413, n.2, p.129-142, 1998.

REDDY, M.K.; ALEXANDER-LINDO, R.L.; NAIR, M.G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.53, n.23, p.9268-9273, 2005.

RESENDE, F.A.; ALVES, J.M.; MUNARI, C.C.; SENEDESE, J.M.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation research**, Amsterdam, v.634, n.1-2, p.112-118, 2007.

RIBEIRO, D.A.; CAMPOS, R.R.; BERGAMASCHI, C.T. Chronic renal failure induces genetic instability in multiple organs of Wistar rats. **European journal of clinical investigation**, Berlin, v.39, n.4, p.289-295, 2009.

RIBEIRO, J.C.; ANTUNES, L.M.; AISSA, A.F.; DARIN, J.D.; DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z.; BIANCHI, M.D. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation research**, Amsterdam, v. 695, n 1-2, p.22-28, 2010

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em células da medula óssea de roedores *in vivo*. **Mutagênese Ambiental**. Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds). Editora Ulbras, Canoas, p.173-198, 2003.

RICHELLE, M.; BORTLIK, K.; LIARDET, S.; HAGER, C.; LAMBELET, P.; BAUR, M.; APPLGATE, L.A.; OFFORD, E.A. A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. **The Journal of nutrition**, Philadelphia, v.132, n.3, p.404-408, 2002.

RIOS ADE, O.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.53, n.6, p.2307-2311, 2005.

ROBERT, P.; CARLSSON, R.M.; ROMERO, N.; MASSON, L. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.80, n.16, p.1115-1120, 2003.

ROJAS, E.; LOPEZ, M.C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal of chromatography. B, Biomedical sciences and applications**, Amsterdam, v.391, p.215-231, 1997.

SALAMONE, M.; HEDDLE, J.; STUART, E.; KATZ, M. Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. **Mutation research**, Amsterdam, v.74, n.5, p.347-356, 1980.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; OLIVEIRA, M.D.M.; PEREIRA, C.A.B.; BEÇAK, W. The protective effect of β -carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation research**, Amsterdam, v.265, n.2, p.237-244, 1992.

SASAKI, Y.F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation research**, Amsterdam, v.519, p.1-2, p.103-119, 2002.

SASAKI, Y.F.; SEKIHASHI, K.; IZUMIYAMA, F.; NISHIDATE, E.; SAGA, A.; ISHIDA, K.; TSUDA, S. The comet assay with multiple mouse organs: comparison of comet assay results and carcinogenicity with 208 chemicals selected from the IARC monographs and U.S. NTP Carcinogenicity Database. **Critical reviews in toxicology**, Boca Raton, v.30, n.6, p.629-799, 2000.

SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J.T. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: implications for cytogenetic screening. **Mutation research**, Amsterdam, v.127, n.2, p.169-174, 1984.

SCHMID W. The micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v.31, n.1, p.9-15, 1975.

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. **Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection**, New York, v.4, p.31-53, 1976.

SCHROOYEN, P.M.; VAN DER MEER, R.; DE KRUIF, C.G. Microencapsulation: its application in nutrition. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.60, n.4, p.475-479, 2001.

SEKIHASHI, K.; YAMAMOTO, A.; MATSUMURA, Y.; UENO, S.; WATANABE-AKANUMA, M.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; TSUDA, S.; SASAKI, Y.F. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. **Mutation research**, Amsterdam, v.517, n.1-2, p.53-75, 2002.

SELLERS, R.S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J.K.; YANO, B.L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. **Toxicologic pathology**, Newark, v.35, n.5, p.751-755, 2007.

SELVAKUMAR, E.; PRAHALATHAN, C.; SUDHARSAN, P.T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide. **Archives of Toxicology**, Berlin, v.80, n.2, p.11511-9, 2006.

SENDÃO, M.C.; BEHLING, E.B.; DOS SANTOS, R.A.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Comparative effects of acute and subacute lycopene administration on chromosomal aberrations induced by cisplatin in male rats. **Food and chemical toxicology**, New York, v.44, n.8, p.1334-1339, 2006.

SHU, B.; YU, W.; ZHAO, Y.; LIU, X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, Maledn, v.76, n.4, p.664-669, 2006.

SILVA, C.R.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological research**, London, v.43, p.561-566, 2001.

SINGH, N.P.; MCCOY, M.T.; TICE, R.R.; SCHNEIDER, E.L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, New York, v.175, n.1, p.184-191, 1988.

SNYDER, R.D. Lovastatin enhances the genotoxicity of doxorubicin in Chinese hamster V79 cells via noncovalent DNA binding. **Drug and chemical toxicology**, New York, v. 32, n.1, p.17-20, 2009.

SPEIT, G.; HARTMANN, A.; The comet assay (single-cell gel test). **Methods Molecular Biology**, Clifton, v.113, p.203-212, 1999.

STAHL, W.; SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.691, p.10-19, 1993

STRATTON, S.P.; SCHAEFER, W.H.; LIEBLER, D.C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of β -carotene. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v.6, p.542-547, 1993.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Philadelphia, v.49, n.5, p.330-352, 2007.

TESORIERE, L.; CIACCIO, M.; VALENZA, M.; BONGIORNO, A.; MARESI, E.; ALBIERO, R.; LIVREA, M.A. Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.269, n.1, p.430-436, 1994.

TEWEY, K.M.; ROWE, T.C.; YANG, L.; HALLIGAN, B.D.; LIU, L.F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, New York, v.226, n.4673, p.466-468, 1984.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.35, n.3, p.206-221, 2000.

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M.T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. **Mutation research**, Amsterdam, v.388(1), p.85-95, 1997.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. Extração e determinação por CLAE de bixina e norbixina em colorificios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.310-313, 2001.

TWEATS, D.J.; BLAKEY, D.; HEFLICH, R.H.; JACOBS, A.; JACOBSEN, S.D.; MORITA, T.; NOHMI, T.; O'DONOVAN, M.R.; SASAKI, Y.F.; SOFUNI, T.; TICE, R. IWGT Working Group. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v.627, n.1, p.92-105, 2007.

VAN MIERT, E.; VANSCHEEUWIJCK, P.; MEURRENS, K.; GOMM, W.; TERPSTRA, P.M.. Evaluation of the micronucleus assay in bone marrow and peripheral blood of rats for the determination of cigarette mainstream-smoke activity. **Mutation research**, Amsterdam, v.652, n.2, p.131-138, 2008.

VANITHA, A.; MURTHY, K.N.; KUMAR, V.; SAKTHIVELU, G.; VEIGAS, J.M.; SAIBABA, P.; RAVISHANKAR, G.A. Effect of the carotenoid-producing alga, *Dunaliella bardawil*, on CCl₄-induced toxicity in rats. **International journal of toxicology**, Washington, v.26, n.2, p.159-167, 2007.

VASQUEZ, M.Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**, Oxford, 2009. In Press. Disponível em <http://mutage.oxfordjournals.org/cgi/reprint/gep060v1>. Acesso em 14/01/2010.

VELANGANNI, A.A.; DHARANEEDHARAN, S.; GERALDINE, P.; BALASUNDRAM, C. Dietary supplementation of vitamin A, C and E prevents p-dimethylaminoazobenzene induced hepatic DNA damage in rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v.44, n.3, p.157-163, 2007.

VENKATESH, P.; SHANTALA, B.; JAGETIA, G.C.; RAO, K.K.; BALIGA, M.S. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study. **Integrative cancer therapies**, Thousand Oaks, v.6, p.1, p.42-53, 2007.

VILE, G.F.; WINTERBOURN, C.C. Inhibition of adriamycin-promoted microsomal lipid peroxidation by beta-carotene, alpha-tocopherol and retinol at high and low oxygen partial pressures. **FEBS letters**, Amsterdam v.238, n.2, p.353-356, 1988.

WAGNER, L.A.; WARTHESEN, J.J. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotene. **Journal of Food Science**, Champaign, v.60, p.1048-1053, 1995.

WAKATA, A.; MIYAMAE, Y.; SATO, S.; SUZUKI, T.; MORITA, T.; ASANO, N.; AWOGLI, T.; KONDO, K.; HAYASHI, M. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.32, n.1, p.84-100, 1998.

WANG, X.D.; RUSSELL, R.M. Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v.57, n.9(Pt1), p.263-272, 1999.

WANG, Y.; WEI, D.; YANG, H.; YANG, Y.; XING, W.; LI, Y.; DENG, A. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Sudan I in food samples. *Talanta*, London, v.77, n.5. p.1783-1789, 2009.

YAMAGISHI, M.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; ADACHI, T.; TAKIZAWA, T.; KUMON, H.; OSAWA, T. Anticlastogenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols against mitomycin C-induced DNA damage. **Food and chemical toxicology**, New York, v.39, n.12, p.1279-1283, 2001.

YAMAUCHI, R.; MIYAKE, N.; INOUE, H.; KATO, K. Products formed by peroxy radical oxidation of beta-carotene. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.41, n.5, p.708-713, 1993.

YNGVE, A. A Historical Perspective of the Understanding of the Link between Diet and Coronary Heart Disease. **American journal of lifestyle medicine**, Thousand Oak, v.3, n.1, 35S-38S, 2009.

YOO, S.H.; SONG, Y.B.; CHANG, P.S.; LEE, H.G. Microencapsulation of alpha-tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v.38, p.1, p.25-30, 2006.

ZHANG, P.; OMAYE, S.T. Antioxidant and prooxidant roles for beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.15, n.1, p13-24, 2001.

ZHANG, Z.; DMITRIEVA, N.I.; PARK, J.H.; LEVINE, R.L.; BURG, M.B. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, n.25, p.9491-9496, 2004.

ANEXO

Termo de aprovação do trabalho frente à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

DECLARAÇÃO

Declaramos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.503.53.3), intitulado: "Avaliação da Atividade Antimutagênica do beta-caroteno Microencapsulado em Células de Ratos Tratados com o Antitumoral Doxorubicina", de autoria de **Alexandre Ferro Aissa** e de **Maria de Lourde Pires Bianchi**, foi aprovado *Ad referendum* e referendado na reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais, realizada em 07.07.2009.

Ribeirão Preto, 8 de julho de 2009.

Christie Ramos Andrade Leite Panissi

Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi
Presidente da CEUA - em exercício