

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2**

Rita de Cássia Silva de Oliveira

Ribeirão Preto

2012

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da
mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2**

Rita de Cássia Silva de Oliveira

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes

Ribeirão Preto

2012

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

FICHA CATALOGRÁFICA

Silva Oliveira, Rita de Cássia

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2.

100 p.: Il.; 30 cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Antunes, Lusânia Maria Greggi.

1. Mandioca. 2. Cianeto. 3. Cozimento 4. Citotoxicidade.
5. Genotoxicidade. 6. Mutagenicidade. 7. Células HepG2

FOLHA DE APROVAÇÃO

Rita de Cássia silva de Oliveira

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a Deus, meu Senhor, digno de toda honra e toda glória, ao meu esposo e filhos, fiéis companheiros, minha mãe e irmãos, pela dedicação.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pois tudo que tenho, tudo que sou e o que vier a ser pertence a Ele. Eu te adoro! Eu te amo! Eu te louvo! Eu te agradeço!

Ao meu querido e amado esposo **Carlos Marcondes** que não mediu esforços para estar comigo nessa jornada até o fim. Eu te amo muito, muito, muito!

Aos meus filhos, **Pedro Vitor** e **Ana Sofia**, que mesmo sendo tão pequenos me deram toda força que precisava. Eu amo vocês muito, muito, muito!

A minha mãe **Rutilam** e minha irmã **Fernanda** que me apoiaram sem limites. Eu amo muito vocês!

Ao meu irmão **Sued** que me ajudou no que precisava. Eu te amo!

Aos Professores **Dr. Adolfo Muller** e **Dr. João Paulo Mendes Filho** por contribuírem com minha formação profissional, me apoiando sempre e me dando a oportunidade de participar de um projeto de pesquisa. Obrigada!

À Professora **Dra. Lusânia Maria Greggi Antunes**, que não levou em conta minhas limitações e me ajudou muito com sua amizade, dedicação, conhecimento, apoio, instrução e, principalmente, tolerância, contribuindo para concretização desse trabalho. Muito, muito obrigada!

Aos meus Coordenadores Professores **Jefferson Ferraz**, **Helena Santos**, **Sinaida Castro**, **Silene Castro** que apoiaram minha ida a São Paulo e conselhos sempre que precisei. Obrigada!

À minha amiga **Patrícia Furlan**, uma irmã, pela amizade, ajuda, incentivo, conhecimento, contribuindo significativamente, até mesmo de longe, para o fechamento desse trabalho. Muito obrigada amiga!

À minha amiga **Mileide Brito** que viveu momentos semelhantes aos meus em Ribeirão Preto e me aconselhou no que precisava. Obrigada amiga!

Aos amigos **Leonardo Mendonça**, **Carla Machado** e **Tarsila Gomes**, que mais de perto acompanharam meu trabalho e me ajudaram sempre que necessário. Obrigada!

Aos **amigos** do Laboratório de Nutrigenômica, Bromatologia e Nutrição pela ajuda, apoio, paciência, instruções. Vocês são alunos nota 10,0. Obrigada!

Aos **funcionários** do Laboratório de Nutrigenômica, Bromatologia e Nutrição por toda ajuda prestada. Obrigada!

À Professora **Dra. Danielle palma de Oliveira**, sempre ajudando no que fosse preciso. Obrigada!

As amigas **Farah, Elisa, Thalita, Gisele** pela ajuda sempre que necessário. Obrigada!

Aos colegas **Kássio, Gilmara, Tássia e Raquel** por partilharem o laboratório de cultura celular comigo. Obrigada!

Aos funcionários do **Laboratório de Bioquímica da FCFRP/USP**, em especial à **Ana Cristina**, pela ajuda, tolerância e atenção. Obrigada!

Às amigas da Secretaria de Pós-graduação **Rosemary Gerolineto e Ana Lúcia**, pela ajuda e atenção. Obrigada!

A todos da USP de Ribeirão Preto que me receberam com carinho. Obrigada!

Aos amigos de Ribeirão Preto que receberam e ajudaram a mim e minha família. Essa cidade ficará marcada em minha memória. Obrigada!

A você que se dispõe a ler essa obra. Obrigada pela atenção!

MUITO OBRIGADA!

E apliquei o meu coração a esquadrinhar, e a informar-me com sabedoria de tudo quanto sucede debaixo do céu; esta enfadonha ocupação deu Deus aos filhos dos homens, para nela os exercitar.

Eclesiastes 1:13

RESUMO

OLIVEIRA, R. C. S. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade da mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em célula tumoral HepG2.** 2012. 100f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

O fator alimentar pode ser considerado um promotor tumorigênico responsável pela etiologia do câncer gástrico no estado do Pará. A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é uma das muitas espécies da Amazônia consumida de modo indiscriminado pelos habitantes da região norte. O cianeto, seu principal componente tóxico, pode ser liberado durante o processamento da mandioca por meio da hidrólise do glicosídeo cianogênico linamarina. No organismo, o cianeto bloqueia a cadeia de transporte de elétrons inibindo a respiração celular e, provocando, entre outras coisas, a produção de radicais livres que podem agir no DNA, através da formação de adutos exocíclicos. O objetivo deste trabalho foi a avaliação da atividade citotóxica, genotóxica e mutagênica de folhas e tucupi, crus e cozidos, de mandioca mansa e brava, usando os ensaios do MTT, cometa e citoma em células HepG2. Os resultados obtidos demonstraram que a viabilidade celular decai à medida que a concentração aumenta na maioria dos grupos de tratamento. No ensaio do cometa, a análise visual demonstrou que o cianeto de potássio, usado como padrão, foi genotóxico em todas as concentrações testadas (5,0; 15,0 e 25,0 µg/mL). As amostras de folhas de mandioca brava foram genotóxicas somente nas concentrações 15,0 e 25,0 µg/mL (cruas) e 5,0; 15,0 e 25,0 µg/mL (cozidas). As amostras de mandioca mansa foram genotóxicas apenas quando cozidas (5,0 e 25,0 µg/mL). Já as amostras de tucupi, tanto cruas quanto cozidas, demonstraram dano ao DNA de células HepG2 em todas as concentrações testadas (20,0; 40,0 e 60,0 µg/mL). Utilizando análise de fragmentação de DNA observamos que o cianeto de potássio foi genotóxico apenas na avaliação da porcentagem de DNA na cauda. Já amostras de mandioca brava e mansa, de maneira geral, demonstraram valores de porcentagem de DNA na cauda, *tail moment* e *olive moment* maiores em relação ao grupo controle negativo, mas, somente as folhas de mandioca, em algumas concentrações, demonstraram valores estatisticamente significativos. Observando o ensaio do citoma, as concentrações de folhas e tucupi, crus e cozidos, tanto de mandioca brava quanto de mandioca mansa mostraram um discreto aumento no número de micronúcleos em células HepG2 binucleadas, estatisticamente não significativo, em relação ao grupo controle negativo. Já o número de pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares foi menor que no grupo controle. Os danos aqui observados pelo ensaio do cometa podem estar transitoriamente presentes

como intermediários formados durante o reparo de lesões no DNA. A ausência de brotos nucleares, pontes nucleoplasmáticas e resultados estatísticos significativos em relação ao grupo controle negativo, não nos permitem afirmar presença de mutagenicidade em células HepG2 tratadas com mandioca tanto brava quanto mansa. De maneira geral, o cozimento das amostras não foi um fator determinante na diminuição do dano observado em células HepG2. Nossos resultados confirmam apenas citotoxicidade e genotoxicidade das variedades da mandioca nas concentrações e sistema celular utilizados. Os mecanismos moleculares que envolvem a genotoxicidade da mandioca requerem estudos futuros. Para o consumo da mandioca devem ser levados em consideração tipo de processamento realizado para extração de compostos cianogênicos, níveis de glicosídeos cianogênicos nos produtos consumidos, quantidade de mandioca consumida e estado nutricional do consumidor.

Palavras-chave: Mandioca, Cianeto, Cozimento, Citotoxicidade, Genotoxicidade, Mutagenicidade, Celulas HepG2.

ABSTRACT

OLIVEIRA, R. C. S. **Assessment of Cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) in HepG2 cells.** 2012. 100f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

The food factor can be considered a tumor causing agent responsible for the etiology of gastric cancer in the state of Pará. Cassava (*Manihot esculenta* Crantz) is one of the many food species of the Amazon indiscriminately consumed by the inhabitants of the northern region. Cyanide, its main toxic component, can be released during cassava processing through the hydrolysis of the cyanogenic glycoside linamarin. In the body, cyanide blocks the electron transport chain by inhibiting cell respiration which brings about, among other things, the production of free radicals which can act upon DNA through the formation of exocyclical adducts. The main goal of this study was the assessment of the cytotoxic, genotoxic and mutagenic role of the leaves and tucupi juice of wild and sweet cassava, both raw and cooked, using the MTT, comet and cytome assays in HepG2 cells. The results gathered have shown that cell viability decreases as the concentration increases in most treatment groups. In the comet assay, a visual analysis has shown that potassium cyanide, used as a standard, was genotoxic in all concentrations tested (5.0, 15.0 and 25.0 µg/mL). Samples of wild cassava leaves were genotoxic only in concentrations of 15.0 and 25.0 µg/mL for raw leaves, and 5.0, 15.0 and 25.0 µg/mL for cooked leaves. Samples of sweet cassava leaves were genotoxic only when cooked (5.0 and 25.0 µg/mL). Yet, samples of tucupi juice, both raw and cooked, have shown damage to DNA in HepG2 cells at all concentrations tested (20.0, 40.0 and 60.0 µg/mL). In performing DNA fragmentation analysis, it was observed that potassium cyanide was genotoxic only in the assessment of percentage DNA in tail. Whereas the wild and sweet cassava samples, in a general fashion, have shown greater values of percentage DNA in tail, tail moment and olive moment than the negative control group, but only the cassava leaves revealed statistically significant values, in some concentrations. For the cytome assay, concentrations of leaves and of tucupi juice, raw and cooked, of both wild and sweet cassava, have shown a slight increase in the number of micronuclei in binucleated HepG2 cells, not statistically significant as compared to the negative control group. On the other hand, the number of nucleoplasmic bridges and nuclear buds in binucleated cells was lower than the value found in the negative control group. The damages verified herein by the comet assay may be transiently present as intermediates formed during repair of DNA lesions. The absence of

nucleoplasmic bridges, nuclear buds and of statistically significant results vis-à-vis the negative control group do not warrant the assertion for the presence of mutagenicity in HepG2 cells treated with either wild or sweet cassava. In general, the cooking of the samples was not determining factor of the decrease in damage observed in HepG2 cells. Our results only confirm cytotoxicity and genotoxicity of wild and sweet cassava species in the concentrations and cell system used. The molecular mechanisms involving genotoxicity of cassava require further studies. For the consumption of cassava, the way of processing performed for extracting cyanogen contents, the levels of cyanogenic glycosides in the products consumed, amount of cassava consumed as well as the nutritional condition of the consumer must be taken into account.

Keywords: Cassava, Cyanide, Cooking, Citotoxicity, Genotoxicity, Mutagenicity, HepG2 cells.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Formação do íon cianeto e ácido cianídrico a partir da degradação do glicosídeo cianogênico linamarina por ação enzimática	6
Figura 2.	Fotomicrografia do dano celular em células HepG2	21
Figura 3.	Fotomicrografia de células HepG2 para análise de micronúcleo (MN), ponte nucleoplasmática (NPB) e broto nuclear (NBUD)	23
Figura 4.	Quantidade de cianeto (CN ⁻) total (mg/kg de folha) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas	26
Figura 5.	Quantidade de cianeto (CN ⁻) livre (mg/kg de folha) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas	27
Figura 6.	Quantidade de cianeto (CN ⁻) total (mg/kg de tucupi) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas	28
Figura 7.	Quantidade de cianeto (CN ⁻) livre (mg/kg de tucupi) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas	29
Figura 8.	Citotoxicidade de doxorubicina (DXR) em células HepG2 tratadas por 24 horas com concentrações de DXR que variaram de 0,05 a 18,6 µg/mL pelo ensaio do MTT	30
Figura 9.	Citotoxicidade de KCN em células HepG2 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do agente pelo ensaio do MTT	31
Figura 10.	Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas por 24 horas com cinco concentrações KCN ou folhas de mandioca da variedade brava, cruas ou cozidas	32
Figura 11.	Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas por 24 horas com cinco concentrações KCN ou folhas de mandioca da variedade mansa, cruas ou cozidas	33
Figura 12.	Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas por 24 horas com cinco concentrações KCN ou tucupi de mandioca da variedade brava, cru ou cozido	34
Figura 13.	Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas por 24 horas com cinco concentrações KCN ou tucupi de mandioca da variedade mansa, cru ou cozido	35
Figura 14.	Porcentagem de DNA na cauda (% DNA <i>in Tail</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folha cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava	41

Figura 15.	Porcentagem de DNA na cauda (% DNA <i>in Tail</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folha cruas ou cozidas de mandioca da variedade mansa	42
Figura 16.	Porcentagem de DNA na cauda (% DNA <i>in Tail</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou tucupi cru ou cozido de mandioca da variedade brava	43
Figura 17.	Produto do comprimento da cauda <i>versus</i> intensidade relativa da cauda (<i>Tail moment</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava	44
Figura 18.	Produto do comprimento da cauda <i>versus</i> intensidade relativa da cauda (<i>Tail moment</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade mansa	45
Figura 19.	Produto do comprimento da cauda <i>versus</i> intensidade relativa da cauda (<i>Tail moment</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de tucupi cru ou cozido de mandioca da variedade brava	46
Figura 20.	Produto do comprimento da cauda <i>versus</i> fração de DNA na cauda (<i>Olive moment</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava	47
Figura 21.	Produto do comprimento da cauda <i>versus</i> fração de DNA na cauda (<i>Olive moment</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade mansa	48
Figura 22.	Produto do comprimento da cauda <i>versus</i> fração de DNA na cauda (<i>Olive moment</i>) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de tucupi cru ou cozido de mandioca da variedade brava	49
Figura 23.	Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade brava	57
Figura 24.	Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade mansa	58
Figura 25.	Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com tucupi de mandioca variedade brava	59

Figura 26.	Média de Brotos nucleares (NBUDs) em células 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade brava	60
Figura 27.	Média de Brotos nucleares (NBUDs) em células 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade mansa	61
Figura 28.	Média de Brotos nucleares (NBUDs) em células 1000 células HepG2 tratadas com tucupi de mandioca variedade brava	62
Figura 29.	Média de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade brava	63
Figura 30.	Média de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade mansa	64
Figura 31	Média de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 tratadas com tucupi de mandioca variedade brava	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Índice de dano, frequência de dano e distribuição das classes de cometa obtidos pela análise visual de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de KCN	36
Tabela 2.	Índice de dano, frequência de dano e distribuição das classes de cometa obtidos pela análise visual de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas cruas e cozidas de mandioca da variedade brava	37
Tabela 3.	Índice de dano, frequência de dano e distribuição das classes de cometa obtidos pela análise visual de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas cruas e cozidas de mandioca da variedade mansa	38
Tabela 4.	Índice de dano, frequência de dano e distribuição das classes de cometa obtidos pela análise visual de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de tucupi cru e cozido de mandioca da variedade brava	39
Tabela 5.	Porcentagem de DNA na cauda, <i>Olive moment</i> e <i>Tail moment</i> obtidas por análise de software em células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de KCN	40
Tabela 6.	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, Porcentagem (%) de células binucleadas e Índice de Divisão Nuclear (NDI) em culturas de células HepG2 tratadas com folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava	50
Tabela 7.	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, Porcentagem (%) de células binucleadas e Índice de Divisão Nuclear (NDI) em culturas de células HepG2 tratadas com folhas cruas e cozidas de mandioca mansa	51
Tabela 8.	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, porcentagem (%) de células binucleadas e Índice de divisão Nuclear (NDI) em culturas de células HepG2 tratadas com tucupi cru e cozido de mandioca brava	52
Tabela 9.	Distribuição de MNs em células binucleadas, total de células binucleadas com MN e total de MNs em células binucleadas em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas de mandioca da variedade brava	53
Tabela 10.	Distribuição de MNs em células binucleadas, total de células binucleadas com MN e total de MNs em células binucleadas em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas de mandioca da variedade mansa	55
Tabela 11.	Distribuição de MNs em células binucleadas, total de células binucleadas com MN e total de MNs em células binucleadas em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas de mandioca da variedade mansa	56

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
ATCC	American Type Culture collection
ATP	Adenosina Trifosfato
BAG	Banco Aditivo de Germoplasma
BN	Binucleada
Cit B	Citocalasina B
CN	Cianeto
CPATU	Centro de Pesquisa Agropecuária do Trópico Um
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido Deoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EDTA	Ethylenediamine Tetraacetic Acid
EMBRAPA	Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária
FCFRP-USP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto- Universidade de São Paulo
HCl	Ácido Clorídrico
HCN	Ácido Cianídrico
HepG2	Linhagem de células de Hepatoblastoma humano
IDN	Índice de Divisão Nuclear
KCN	Cianeto de Potássio
Kg	Kilograma
LMP	Low Melting fusion Point
Mg	Miligrama
µg	Micrograma

MN/MNs	Micronúcleo/Micronúcleos
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenilbrometo de tetrazolina
NaCl	Cloreto de Sódio
NADPH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo fosfato Hidrogenado
NaOH	Hidróxido de Sódio
NBUDs	Nuclear Buds
NPBs	Nucleoplasmic Bridges
PBS	Buffer Phosphate Saline
pH	Potencial Hidrogeniônico
q.s.p.	Quantidade Suficiente Para
SBF	Soro Bovino Fetal

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas e Siglas	ix
1. INTRODUÇÃO	2
1.1 O Câncer no Mundo, no Brasil e no Estado do Pará.....	2
1.2 Vegetais da Amazônia: A Mandioca (<i>Manihot esculenta</i> Crantz).....	3
1.3 Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade em Cultura Celular.....	7
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAL E MÉTODOS	15
3.1 Coleta das Variedades de Mandioca e Quantificação do Cianeto Total e Livre.....	15
3.2 Obtenção das Células e Manutenção da Linhagem Celular.....	17
3.3 Tratamento das Células HepG2 para Avaliação da Viabilidade Celular.....	17
3.4 Tratamento das Células HepG2 para o Ensaio do <i>Single-Cell Gel Electrophoresis</i> (Ensaio do cometa) e Análise das Lâminas.....	18
3.5 Tratamento das Células HepG2 para o Ensaio do Citoma e Análise das Lâminas.....	21
3.6 Análises Estatísticas	23
4. RESULTADOS	25
4.1 Determinação das Concentrações de Cianeto Total e Livre nas Amostras de Mandioca.....	25
4.1.1 Determinação de Cianeto Total nas Folhas de Mandioca Brava e Mansa.....	25
4.1.2 Determinação de Cianeto Livre nas Folhas de Mandioca Brava e Mansa.....	26
4.1.3 Determinação de Cianeto Total no Tucupi de Mandioca Brava e Mansa.....	27
4.1.4 Determinação de Cianeto Livre no Tucupi de Mandioca Brava e Mansa.....	28
4.2 Ensaio de Viabilidade Celular Em Células HepG2	29
4.2.1 Ensaio de Viabilidade Celular para Determinação da Concentração do Controle Positivo Doxorubicina	29

4.2.2 Ensaio de Viabilidade Celular Para KCN.....	30
4.2.3 Ensaio de Viabilidade Celular Para as Amostras de Mandioca	31
4.2.3.1 Ensaio de Viabilidade Celular Para as Folhas de Mandioca Brava.....	31
4.2.3.2 Ensaio de Viabilidade Celular Para as Folhas de Mandioca Mansa	33
4.2.3.3 Ensaio de Viabilidade Celular Para o Tucupi de Mandioca Brava.....	34
4.2.3.4 Ensaio de Viabilidade Celular Para Tucupi de Mandioca Mansa	35
4.3 Ensaio de Genotoxicidade Utilizando o Ensaio do Cometa.....	36
4.4 Ensaio de Mutagenicidade Utilizando o Ensaio do Citoma.....	49
5. DISCUSSÃO	67
5.1 Avaliação dos Compostos Cianogênicos das Amostras de Mandioca Após Cozimento	67
5.2 Avaliação dos Ensaio de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade	71
6. CONCLUSÕES.....	83
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 O Câncer no Mundo, no Brasil e no Estado do Pará

O câncer é diagnosticado em aproximadamente 11 milhões de pessoas no mundo, sendo responsável por quase 8 milhões de mortes todo ano (FRESCO et al., 2006; GONZALEZ; RIBOLI, 2010). O câncer gástrico é o quarto tipo de câncer mais comum no mundo e a segunda causa de óbito por câncer (LADEIRA et al., 2005; TEPEZ, 2009). A incidência é alta na América do Sul (BRENNER; ROTHENBACHER; ARNDT, 2009). No Brasil, as estimativas, para o ano de 2011 apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos de câncer e em particular, o câncer gástrico já é a quarta maior causa de morte por doença (CASARETTO; SOUSA; MARI, 2006; IARC, 2010; INCA, 2010) e está relacionado principalmente com a infecção por *Helicobacter pylori* (COMPARE; ROCCO; NARDONE, 2010; GUERRA et al., 2005). Hábitos alimentares como o consumo de aditivos alimentares, nitratos/nitritos, elevado teor de sal e baixa ingestão de frutas e vegetais estão associados com o aumento do risco a esse tipo de câncer (COMPARE; ROCCO; NARDONE, 2010; EICHHOLZER, 2000; GAROFOLO et al., 2004; SCHATZKIN et al., 2009).

No Pará, o câncer gástrico ainda constitui importante problema de saúde pública, onde as taxas de mortalidade apresentam valores acentuados (MOUTINHO, 1986). O carcinoma gástrico nessa região do País possui sua gênese, principalmente, em carcinógenos genotóxicos provenientes da dieta regional (RESENDE; MATTOS; KOIFMAN, 2006). A maioria dos carcinógenos genotóxicos se comporta como um composto estável que, por ação de enzimas, são biotransformados em produtos eletrofílicos que poderão reagir com a molécula do DNA, formando adutos. Esses últimos tendem a ser reparados por enzimas de reparo, mas caso isso não ocorra, podem surgir alterações permanentes no DNA. Para o surgimento do tumor, estas alterações podem envolver genes que normalmente atuam no controle do ciclo celular (SUTANDYO, 2010).

1.2 Vegetais da Amazônia: A Mandioca (*Manihot esculenta* Crantz)

O Brasil é rico em vegetais que são utilizados como alimentos, pois emanam fragrâncias das suas folhas, caules, sementes, raízes ou flores, que podem ser mais ou menos intensas, sendo utilizados para compor pratos tradicionais de uma determinada região. Essas plantas também possuem grande importância nutricional, sendo fonte de inúmeras vitaminas e aminoácidos essenciais, indispensáveis às funções vitais do organismo, possuindo em sua composição compostos ou moléculas que podem servir como fatores de proteção para o organismo (CEMELLI; BAUMGARTNER; ANDERSON, 2009; FERGUSON; PHILPOTT; KARUNASINGHE, 2004; HOELZL et al., 2009; UTTARA et al., 2009). Por outro lado, alimentos de origem vegetal podem conter quantidades significativas de compostos químicos capazes de provocar mutações e câncer (COLLINS, 1998; GAROFOLO et al., 2004).

A mandioca é uma planta dicotiledônea da família Euphorbiaceae e gênero *Manihot*. Este gênero apresenta pelo menos 5000 variedades de cassava principalmente na América do Sul, África, Ásia e México (BAYOUMI et al., 2010; EL-SHARKAWY, 2004; NASSAR; HASHIMOTO; FERNANDES, 2008; NASSAR; ORTIZ, 2010), sendo que a única cultivada para fins alimentícios é a *Manihot esculenta* Crantz, podendo ser de variedade (cultivar) amarga (também chamada de brava) ou doce (também chamada de mansa), dependendo da quantidade do componente tóxico cianeto presente na planta (LI et al., 2010; MANZANO; SOUZA; GÓRNIK, 2006; SORNYOTHA; KYU; RATANAKHANOKCHAI, 2010). A variedade brava de mandioca possui altas concentrações de glicosídeos cianogênicos (320-1120 µg CN/g) em relação à variedade mansa (27-77 µg CN/g) (LOPES, 2001), o que faz a variedade brava ser bem mais processada por cozimento antes de ser consumida (ARIAS et al., 2001; DORÉA, 2004; SOLER-MARTÍN et al., 2010).

O conteúdo cianogênico também está relacionado à idade do vegetal, folhas jovens contêm altos níveis de glicosídeos cianogênicos, já folhas maduras e velhas, 50% e 70% menos, respectivamente, enquanto que folhas senescentes contêm quantidades quase que negligenciáveis desses cianocompostos. Por outro lado, partes do vegetal como folhas, caule e córtex (casca) das raízes contêm maior

concentração do glicosídeo cianogênico linamarina (> 400mg/kg HCN eq.) em relação ao parênquima das raízes (< 100 mg/kg) (NAMBISAN, 2011).

Como alimento, a mandioca é considerada a 3^a fonte mais eficiente de calorias na dieta humana em regiões tropicais, depois do arroz e milho, tendo alta digestibilidade (SORNYOTHA; KYU; RATANAKHANOKCHAI, 2010), elevada quantidade de amido, e pequenas quantidades de aminoácidos essenciais, vitaminas e ferro (DORÉA, 2004; NASSAR; ORTIZ, 2010), sendo usada no combate a fome em muitos países (IDIBIE; DAVIDS; IYUKE, 2007; DAVIDS; IYUKE, 2007; WOBETO et al., 2007) e consumida em uma grande variedade de formas. Em todo o Brasil, a raiz é transformada em farinha (mandioca brava) ou pedaços cozidos e fritos (mandioca mansa) (CHISTÉ; COHEN, 2008; CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2010). Há também o preparo da goma e de tucupi, definido como molho parcialmente fermentado, obtido de água prensada (manipueira) da massa triturada ou ralada de mandiocas de polpa amarela, reconhecidamente brava (dosagem acima de 100 mg de HCN/kg de raiz fresca sem casca), apresentando alto teor de linamarina (CHISTÉ; COHEN, 2006; CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2007). As folhas são moídas e cozidas com água acrescida de vários condimentos por alguns dias para preparação de um prato, de influência africana e indígena, típico da região Norte, a maniçoba.

O consumo de cassava constitui 80% da dieta dos amazônidas e a farinha representa um dos principais componentes da dieta alimentar da população nortista, cuja média de consumo pode ser de 34 kg por ano (IBGE, 2010). Com o cozimento há perda de nutrientes, como vitaminas antioxidantes A e C, porém é essencial para redução da toxicidade (ARIAS et al., 2001; DORÉA, 2004; RESENDE; MATTOS; KOIFMAN, 2006). Se considerarmos o molho de tucupi como uma bebida não alcoólica, na preparação tacacá, por exemplo, seu consumo anual per capita em Belém, capital do Pará é de 33,222 kg (IBGE, 2010). Já como condimento, na preparação pato no tucupi, por exemplo, seu consumo anual per capita em Belém é de 0, 523 kg (IBGE, 2010). A ingestão, tanto das folhas cozidas quanto do tucupi tem sido restrito pela presença de substâncias antinutricionais (PADMAJA, 1995; WOBETO et al., 2007).

O potencial tóxico da mandioca deve-se a presença de glicosídeos cianogênicos, como a lotaustralina (menos de 10%) e linamarina (mais de 90%) (FORSLUND et al., 2004; IDIBIE; DAVIDS; IYUKE, 2007; DAVIDS; IYUKE, 2007). Os precursores para a biosíntese de linamarina e lotaustralina são os aminoácidos valina e isoleucina (NAMBISAN, 2011). A linamarina (2-hidroxi isobutironitrila- β -D-glicopiranosil) está presente em vacúolos por toda a planta, principalmente na casca da raiz e nas folhas, não sendo, por si só, tóxico até sofrer hidrólise por ação da enzima linamarase, uma β -glicosidase, encontrada em apoplastos da parede celular vegetal, resultando na produção de glicose e acetocianidrina, que posteriormente é decomposta, por ação de outra enzima, uma α -hidroxinitriloliase, em acetona e um componente altamente tóxico, o íon cianeto (Figura 1) (IDIBIE; DAVIDS; IYUKE, 2007; DAVIDS; IYUKE, 2007; KOLIND-HANSEN; BRIMER, 2010; VETTER, 2000). Esta reação pode ocorrer espontaneamente em pH > 6,0 ou quando o tecido vegetal é triturado, como no processamento ou na ingestão, permitindo o contato do substrato com a enzima mediadora de sua hidrólise (SOUZA; MENEZES, 2004; NAMBISAN, 2011).

A cianogênese é, primariamente, um mecanismo de proteção para a planta contra agentes herbívoros (LI et al., 2010; SIRITUNGA; SAYRE, 2004). Porém, a exposição humana prolongada ao cianeto, em baixas concentrações, provoca toxicidade crônica, como redução de peso, hipotireoidismo e distúrbios neurológicos (CAROD-ARTAL; VARGAS; DEL NEGRO, 1999; SOTO-BLANCO; GÓRNIK, 2010). O limite de 50 mg a 100 mg/kg do ácido cianídrico (HCN) quando consumido produz alta toxicidade (HELBIG et al., 2008; KOLIND-HANSEN; BRIMER, 2010; LOPES, 2001). Segundo o *Codex Alimentarius Commission* da FAO/WHO (1988), a margem de segurança estabelecida para o HCN em produtos de mandioca é abaixo de 10 mg HCN/kg de matéria fresca ou 300 mg/kg matéria seca, o que equivaleria a uma ingestão de 5 mg por 24 horas. Esses dados se referem a uma dieta básica de 1500 Kcal (HELBIG, 2008; LOPES, 2001).

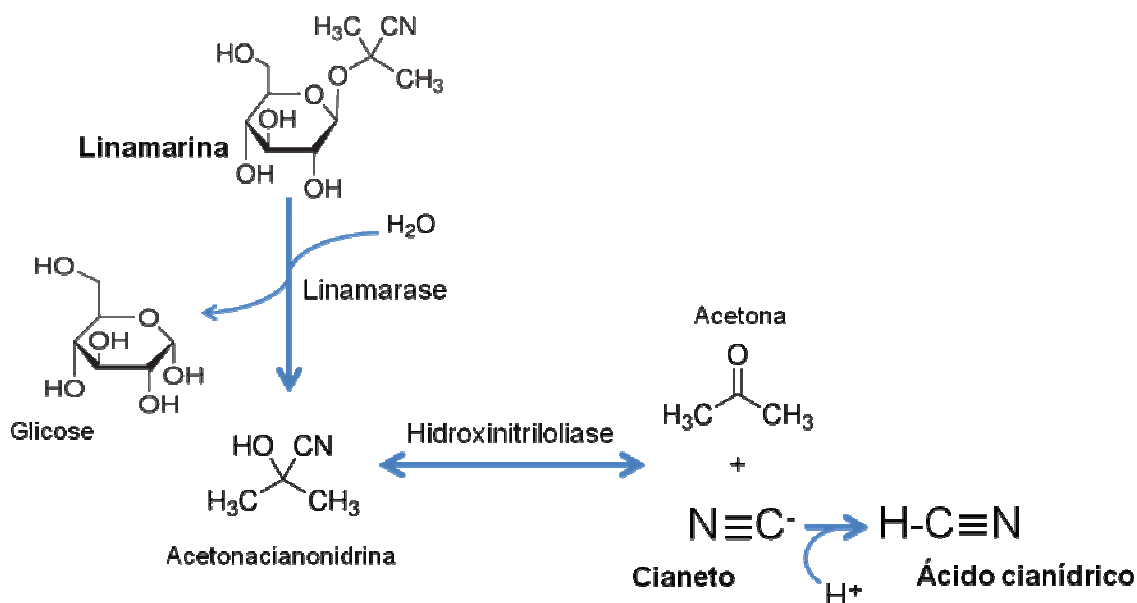


FIGURA 1: Formação do íon cianeto e ácido cianídrico a partir da degradação do glicosídeo cianogênico linamarina por ação enzimática. Adaptado de Vetter, 2000.

Vários tipos de doenças como ataxia polineuropática em populações do sudeste da Nigéria (KAMALO, 1995; OLUWOLE et al., 2002, 2003), hemorragias (KAMALO, 1993; VETTER, 2000), retardo no crescimento de crianças da República Democrática do Congo (BAENA-MATAMBY et al., 2000), hipotireoidismo, neuropatia óptica de Leber (MANZANO; SOUZA; GÓRNIK, 2006), dores no estômago, diarreia, dor de cabeça, vômito, mal-estar geral (SORNYOTHA; KYU; RATANAKHANOKCHAI, 2010) convulsões e konzo, uma doença neurotóxica que causa paralisia permanente dos membros inferiores, principalmente em mulheres e crianças de áreas rurais da África, são provocadas pelo mau processamento principalmente da variedade amarga de mandioca (SOLER-MARTÍN et al., 2010).

O cianeto, quando absorvido, se difunde livremente através das membranas celulares. Sua ação bioquímica primária consiste na interferência na cadeia de transporte de elétrons na mitocôndria eucariótica, por possuir alta afinidade pela forma heme-férrica da enzima citocromo oxidase, participante do complexo IV da cadeia, inibindo a etapa citocromo-a-citocromo-a₃, desfavorecendo a fosforilação oxidativa e, conseqüentemente a formação de adenosina trifosfato (ATP) (HARIHARAKRISHNAN et al., 2009; MILLS et al., 1996; SHANG et al., 2008; ZHU et al., 2007).

A mudança no complexo IV da cadeia de transporte de elétrons pelo cianeto induz escape de elétrons, principalmente pelos complexos I e III, os quais reagem com moléculas de oxigênio produzindo espécies reativas de oxigênio, principalmente radicais superóxidos e peróxido de hidrogênio. Esses radicais livres podem oxidar diretamente as bases do DNA, ou provocar peroxidação de lipídios e formação de hidroperóxidos como produtos primários, podendo levar a célula a um estresse oxidativo (GARCÍA-ESCUDERO; GARDINI; IZQUIERDO, 2008; HARANGI et al., 2002, 2004; HARIHARAKRISHNAN et al., 2009; ZHU et al., 2007). A subsequente decomposição de produtos primários resulta na formação de aldeídos reativos, os quais modificam covalentemente as bases do DNA (BOBY; INDIRA, 2003; SHANG et al., 2008; SPITELLER et al., 2001; TUDEK et al., 2010), produzindo adutos exocíclicos (SUTANDYO, 2010; WINTER; SEGALL; HADDON, 1986), podendo alterar a capacidade de reparo do DNA, levando à mutações nos proto-oncogenes e genes supressores tumorais e, conseqüentemente, à transformação neoplásica e carcinogênese (COLLINS, 1998; KUMARAGURUPARAN et al., 2002).

O organismo consegue detoxificar o cianeto através da ligação deste com a enzima, acetilsulfotransferase ou rodanase, catalisando a transferência de um átomo de enxofre de um doador, como tiosulfato ou aminoácidos sulfurados da dieta, para o cianeto, formando o tiocianato, irreversivelmente (BHATTACHARYA; RAO; VIJAYARAGHAVAN, 2002; MANZANO; SOUZA; GÓRNIK, 2006). Este último composto produzido não consegue ligar-se a citocromo c oxidase, porém é bociogênico, competindo com o iodo em sua captação pela glândula tireóide. Doutra forma, o tiocianato é excretado, principalmente pela urina. A intoxicação aguda só ocorrerá se a capacidade de detoxificação pelo organismo for excedida (GARCÍA-ESCUDERO; GARDINI; IZQUIERDO, 2008; LI et al., 2010).

1.3 Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade em Cultura Celular

Ensaio *in vitro* podem ser realizados com diversas linhagens celulares, como por exemplo, a linhagem obtida de hepatoblastoma humano de um menino argentino de 11 anos, conhecida como linhagem celular HepG2 (MOORE; YEDJOU;

TCHOUNWOU, 2010; TSUBOY, 2007; UHL; HELMA; KNASMULLER, 1999, 2000; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003). Essas células possuem a capacidade de metabolismo pelas enzimas de Fases I e II igualmente aos hepatócitos de células normais funcionais e desempenham papel chave na ativação e detoxificação de carcinógenos reativos (CHEQUER et al., 2009; HRELJAC et al., 2008; JIN et al., 2009; KNASMÜLLE et al., 2004; UHL; HELMA; KNASMULLER, 2000; RAO et al., 2009), sendo ideais para estudos de mutagenicidade (JIANG et al., 2007; MAJER et al., 2004; MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004). Células HepG2 possuem a capacidade de reter muitas funções especializadas, as quais normalmente são perdidas em cultura primária de hepatócitos, pois conservam proteínas essenciais para o metabolismo hepático, enzimas e componentes de fase I, como citocromo P450 (CYP) 1A1, 1A2, 2B, 2C, 3A e 2E1, hidroxilases, citocromo c, redutase, N-demetilase, catalases, peroxidases, NADPH e enzimas de fase II como, epóxido hidrolase, sulfotransferase, glutathiona S-transferase, uridina glucoronosil transferase e N-acetil transferase (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004).

Toxicidade celular, em geral, significa prejuízo celular induzido por algum agente citotóxico. O parâmetro mais utilizado para avaliar a toxicidade celular é viabilidade celular, que pode ser evidenciada com auxílio de corantes vitais, desta forma, o uso de ensaios que determinem a viabilidade celular é crucial em estudos toxicológicos (ROGERO et al., 2003). Estes ensaios podem ser realizados em sistema celulares *in vitro*, sendo relativamente fáceis de execução (DONATO et al., 2008).

A citotoxicidade em cultura de células pode ser avaliada utilizando ensaios colorimétricos, como aquele que utiliza um sal tetrazolina amarelo 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difenil brometo tetrazolina, conhecido como ensaio MTT. É um ensaio colorimétrico quantitativo avaliando a viabilidade de células expostas a determinadas concentrações de compostos citotóxicos (BOPP; LETTIERI, 2008; MOORE; YEDJOU; TCHOUNWOU, 2010; PERES et al., 2008), como a mandioca, por exemplo. O MTT quando encubado com células vivas, tem seu substrato quebrado por enzimas mitocondriais funcionais. O composto amarelo do sal de MTT transforma-se em um composto azul escuro, denominado formazan. A produção de formazan reflete o estado funcional da cadeia respiratória (PERES et al., 2008). A medida por colorimetria de formazan reflete diretamente o número de células viáveis.

Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas exposto. Já mutagenicidade, diz respeito à indução de alterações transmissíveis permanentes da quantidade ou da estrutura do material genético. Os testes de genotoxicidade visam detectar mutágenos e carcinógenos, estudar os mecanismos de mutagênese e carcinogênese química, e avaliar os perigos de compostos químicos mutagênicos e carcinogênicos para os seres humanos (SASAKI et al., 2000; WASSON; MCKELVEY-MARTIN; DOWNES, 2008). Desta forma, o potencial genotóxico de um composto pode ser avaliado por meio de ensaios que investiguem o dano genômico como o ensaio de eletroforese em gel de célula única, conhecido como ensaio do cometa, por exemplo. É um ensaio simples, rápido, sensível e eficiente, usado para quantificar as lesões e detectar os efeitos do reparo no DNA em células individualizadas de mamíferos. Este ensaio é baseado na medida de fragmentos de DNA que migram em um campo elétrico (CASTANEDA et al., 2005; JIANG et al., MUGHAL et al., 2010; PITOZZI et al., 2006; 2007).

De maneira geral, células englobadas em gel e espalhadas sobre uma lâmina, são submetidas a uma corrente elétrica que age como uma força proporcionando a migração dos segmentos de DNA livres, resultantes de quebras, para fora do núcleo. Essas quebras nas moléculas de DNA podem ser de fita simples, duplas fitas, *crosslinks*, sítios de reparo por excisão e/ou lesões álcali-lábeis, induzidas por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes (CEMELI; BAUMGARTNER; ANDERSON, 2009; FORCHHAMMER et al., 2010; TSUBOY et al. 2007; VALVERDE; ROJAS, 2009). Após a eletroforese, as células que apresentam um núcleo íntegro são identificadas como normais, sem dano detectável no DNA. Por outro lado, as células lesadas são identificadas visualmente por uma espécie de cauda, similar a um cometa, formada pelos fragmentos de DNA. Estes fragmentos podem se apresentar em diferentes tamanhos, sendo a extensão da migração proporcional ao número de quebras sofridas pelo DNA. Desta forma, a aparência do DNA danificado se torna similar a de um cometa (AZQUETA; LORENZO; COLLINS, 2009; JIANG et al., 2007). Utilizando microscopia, descrições quantitativas do dano provocado pelo agente agressor podem ser determinadas. Existe uma escala visual de dano de acordo com a intensidade ou tamanho da cauda que vai de 0 (nenhum dano) até 4 (máximo de dano) (COLLINS, 2004).

A potencialidade mutagênica, por sua vez, pode ser avaliada utilizando um ensaio *in vitro*, essencial no estudo da mutagênese, denominado ensaio do micronúcleo (MN), um bioindicador de efeito clastogênico ou aneugênico, revelando a instabilidade genômica (IARMARCOVAI et al., 2009; LINDBERG et al., 2007; 2009; MUGHAL et al., 2010; TERRADAS, et al., 2010; THIERENS; VRAL, 2009). O ensaio do MN é utilizado em cultura de células de forma bem simples, onde, após a exposição celular a agentes mutagênicos, micronúcleos são formados a partir de pequenos fragmentos de cromossomos acêntricos que não foram incorporados no núcleo ou por cromossomos inteiros que atrasaram na anáfase durante a divisão celular. Esses fragmentos, ou cromossomos atrasados, são envolvidos por membrana nuclear, durante a telófase, e aparecem como pequenos núcleos no citoplasma, além do núcleo principal (CEPPI et al., 2010; IARMARCOVAI et al., 2008; THIERENS; VRAL, 2009), apresentando perda de cromatina em consequência de dano cromossômico estrutural ou dano no aparelho mitótico não reparado previamente. Os danos causados no DNA são expressos em micronúcleos após um ciclo de divisão celular (BONASSI et al., 2007; FENECH, 2000; VALENTIN-SEVERIN et al. 2003).

Um adjuvante no ensaio do MN, a fim de tornar os resultados deste último fidedignos, é o ensaio do citoma. A partir da adição de citocalasina B (citB), um inibidor da polimerização da actina e esta última, indispensável para a formação do anel de microfilamentos que levam a contração do citoplasma e clivagem da célula em duas células filhas, ocorre o bloqueio da citocinese, mas não da divisão nuclear, em consequência disso, um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão é observado (THIERENS; VRAL, 2009). Ocasionalmente, pontes nucleoplasmáticas (NPBs - "Nucleoplasmic Bridges") entre núcleos de células binucleadas podem ser visualizadas em microscopia. Isto é devido aos cromossomos dicêntricos, nos quais os dois centrômeros são puxados para lados opostos da célula na anáfase, resultando em uma ponte nucleoplasmática. Desta forma, a formação de pontes nucleoplasmáticas fornece um parâmetro de análise de dano cromossômico adicional (DUAN et al., 2009; FENECH, 2000; 2006). Micronúcleos também podem ser formados através de brotamento nuclear na interfase, quando este processo é incompleto dará origem a brotos nucleares (NBUDs - "Nuclear Buds"), os quais permanecem presos ao núcleo

por uma fina ponte nucleoplasmática (FENECH, 2006; LINDBERG et al., 2007). Por outro lado, brotos nucleares podem ser formados durante a fase S da mitose por DNA amplificado localizado em sítios específicos na periferia do núcleo em células tumorais humanas (EL-ZEIN et al., 2008; FENECH, 2006). Pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares são indicadores promissores no monitoramento de dano genético (DUAN et al., 2009).

Dentro deste contexto, é clara a importância do estudo do potencial cianotóxico da mandioca proveniente da dieta paraense, em sistema *in vitro*, utilizando linhagens celulares com boa capacidade de metabolismo de carcinógenos reativos (KNASMÜLLER et al., 2004; UHL; HELMA; KNASMULLER, 2000), bem como, ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade que elucidem a influência da mandioca como um dos fatores ambientais contribuintes para a elevada frequência de câncer gástrico no Estado do Pará.

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

Utilizando amostras de folhas e tucupi, crus e cozidos, provenientes das variedades brava e mansa de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz), este estudo teve como objetivos:

- Determinar a quantidade de cianeto total e livre presentes nas amostras de mandioca;
- Verificar se o cozimento empregado foi suficiente na extração os compostos cianogênicos das amostras;
- Determinar a viabilidade celular, utilizando o ensaio do MTT em cultura de célula tumoral HepG2, tanto de cianeto de potássio (KCN) quanto das amostras de mandioca;
- Utilizar o ensaio de eletroforese em gel de célula única (cometa) para determinar a possível genotoxicidade, em cultura de célula tumoral HepG2, do KCN e de amostras de mandioca em diferentes concentrações;
- Utilizar o ensaio do citoma para determinar a possível genotoxicidade e mutagenicidade, em cultura de célula tumoral HepG2, das amostras de mandioca em diferentes concentrações;
- Analisar os resultados obtidos nos ensaios realizados com células HepG2 a fim de determinar se o cozimento das amostras de mandioca interferiu nos resultados, possivelmente encontrados, de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade.

**MATERIAL E
MÉTODOS**

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Coleta das Variedades de Mandioca e Quantificação do Cianeto Total e Livre

A mandioca utilizada nesse estudo pertence à ordem Malpighiales, família Euphorbiaceae, gênero *Manihot* e espécie *Manihot esculenta* Crantz. As variedades, brava e mansa, de mandioca foram colhidas no mês de julho do herbário IAN (Instituto Agrônomo do Norte) da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Amazônia Oriental-PA. A EMBRAPA obteve as mudas para o plantio e composição do banco aditivo de germoplasma (BAG) das regiões de Santarém, Bragança e Viseu. A idade das plantas para os testes de teor de CN⁻ total e livre variou entre 10 e 12 meses, observada a partir do BAG de mandioca e o número do *Voucher* das variedades estudadas, de acordo com o BAG, foi CPATU 148, para a variedade mansa e CPATU 305, para variedade brava. Os ensaios para quantificação de CN⁻ total e livre foram baseados na metodologia descrita por Chisté, Cohen e Oliveira (2007; 2010) e as análises da quantificação do cianeto foram realizadas no Laboratório de Agroindústria da própria Empresa.

Depois de colhidas, as variedades de mandioca foram higienizadas, com água corrente tratada, para a retirada de resíduos de terra. As raízes foram separadas das folhas e descascadas cuidadosamente com auxílio de faca de aço inox, para que a película externa fosse removida. As raízes descascadas foram trituradas em multiprocessador e prensadas em tipiti para retirada de um líquido chamado manipueira, o qual ficou em repouso por 24 horas em temperatura ambiente para sedimentação de impurezas e decantação do amido, o qual foi removido. Posteriormente à sedimentação, uma parte do líquido obtido, cognominado tucupi, foi reservada e pesada dentro de um becker de 500 mL em balança analítica, sendo posteriormente processada juntamente com 6,8 mL de ácido ortofosfórico, 250 mL de álcool etílico e água destilada q.s.p. 1000 mL, solução chamada de extratora. O conteúdo processado foi filtrado a vácuo em funil de Buchner com filtro de papel qualitativo 110 g/m². O filtrado foi armazenado em recipiente, onde foi medido seu volume final em proveta para quantificação de CN⁻ total e livre (amostra sem cozimento). Outra parcela do tucupi foi fervida em fogão

industrial por 1 hora aproximadamente 90 °C. Após esse período, a amostra foi pesada dentro de um becker de 500 mL em balança analítica e igualmente processada com solução extratora e o conteúdo foi filtrado a vácuo e armazenado em recipiente, onde foi medido seu volume final em proveta para quantificação de CN⁻ total e livre (amostra com cozimento).

As folhas frescas foram trituradas em liquidificador (5 mim 1500 rpm) e a uma parte foi adicionada solução extratora, sendo o conteúdo processado filtrado a vácuo e armazenado em recipiente, onde foi medido seu volume final em proveta para quantificação de CN⁻ total e livre (amostra sem cozimento). Outra parcela do material folhoso foi fervida com água por período mínimo de 24 horas a 90°C e após esse tempo, solução extratora foi adicionada a amostra e o material obtido igualmente processado e filtrado para quantificação de CN⁻ total e livre (amostra com cozimento).

A quantificação de CN⁻ das amostras é feita a partir da reação de oxidação do íon cianeto a haleto de cianogênio cloroamina T ou N-clorosuccinimida. Este composto reage com ácido isonicotínico para produzir um dialdeído que acopla com aminas ou compostos com o grupamento metileno, como ácido dimetilbarbitúrico para formar um complexo colorido, o qual é lido em espectrofotômetro a 605 nm (AMORIM; MEDEIROS; RIET-CORREA, 2006; CHISTÉ; COHEN, 2008; CHISTÉ; COHEN; OLIVEIRA, 2010). Às leituras obtidas, foi aplicada a equação proveniente de uma curva padrão de KCN. A concentração estoque de KCN usada foi de 326 µg de KCN/mL. A curva padrão foi efetuada adicionando-se volumes crescentes da solução estoque, que variaram de 0,20 a 1,40 µg de HCN em um litro de solução de NaOH 0,2 M.

Parte das amostras de mandioca (folha e tucupi), a qual não foi misturada a solução extratora, mas somente água, foi armazenada em recipiente plástico estéril sob temperatura entre - 10 a - 15 °C e transportada congelada via aérea até o laboratório de Bromatologia e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas em Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FCFRP-USP), onde os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade foram realizados.

3.2 Obtenção das Células e Manutenção da Linhagem Celular

As células de hepatoblastoma humano (HepG2), obtidas da ATCC (*American Type Culture Collection*), foram gentilmente cedidas pela Profa. Dra. Danielle Palma de Oliveira do Laboratório de Toxicologia Ambiental da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP. Essas células foram mantidas a -195°C (nitrogênio líquido) em alíquotas de 10^6 células/mL em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle Médium (DMEM) (Gibco Co.), 40% de soro bovino fetal (SBF) (Gibco Co.) e 10% de dimetilsulfóxido (DMSO – CAS 67-68-5) (Merck, SA). O meio utilizado no cultivo das células foi o DMEM suplementado com 10% de SBF; 2,38 mg/mL de tampão HEPES (Sigma-Aldrich Co.), 1,2 mg/mL de bicarbonato de sódio (Sigma-Aldrich Co.), e antibiótico: estreptomicina/penicilina (0,1mg/mL) (Invitrogen Ltda.). O meio DMEM suplementado com SBF foi denominado meio completo.

3.3 Tratamento das Células HepG2 para Avaliação da Viabilidade Celular

Neste estudo foi utilizado o teste com solução do sal MTT, originalmente descrito por Mossman (1983), mas baseado na metodologia de Peres et al. (2008). A partir da terceira passagem celular, as células HepG2 foram semeadas em placas de cultura de ELISA com 96 poços (placa TPP 92096) a um volume de 100 μL , com densidade de 5×10^4 células/mL de meio DMEM completo e incubadas por 24 horas em 5% de CO_2 a 37°C em estufa (Thermo Electron Co.). Após esse período, as células foram tratadas (100 μL /poço) com KCN diluído em meio completo (5,0; 10,0; 20,0; 25,0; 40,0; 60,0; $1,7 \times 10^3$ e $17,0 \times 10^3$ $\mu\text{g/mL}$) ou folhas moídas (solução), de mandioca brava ou mansa (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$) ou tucupi proveniente de mandioca brava (5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 60,0 $\mu\text{g/mL}$) ou tucupi de mandioca mansa (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$) ou doxorubicina (DXR) (CAS 23214-92-8), obtida na sua formulação comercial Rubidox®, do laboratório Bergamo - Brasil, nas concentrações 0,05; 0,3; 0,6; 1,2; 2,3; 4,6; 9,3 e 18,6 $\mu\text{g/mL}$) e incubadas por mais 24 horas em 5% de CO_2 a 37°C em estufa.

As concentrações de KCN foram determinadas de acordo com os valores de CN^- total presente nas amostras de mandioca brava e mansa, quantificado

previamente. O controle positivo do ensaio foi a substância citotóxica DXR, cujas concentrações escolhidas para esse ensaio foram embasadas na literatura (LEE; LAU; NG, 2002; YE et al., 2007). A placa tratada foi encubada por 24 horas em 5% de CO₂ a 37 °C em estufa. Após esse período, foi acrescentado 10 µL de solução de MTT (5 mg/mL) dissolvido em tampão fosfato salino pH 7.4 (Buffer Phosphate Saline – PBS) (0,2 g de cloreto de potássio, 0,2 g de fosfato monobásico de potássio, 8,0 g de cloreto de sódio, 1,15 g de fosfato dibásico de sódio anidro em água deionizada q.s.p. 1000 mL) e nova incubação em 5% de CO₂ a 37 °C em estufa por ± 2,5 horas a fim de ter o substrato MTT quebrado por enzimas mitocondriais viáveis.

O controle negativo para este ensaio foram células HepG2 em meio completo, que não receberam solução de KCN, nem solução de folha de mandioca, nem tucupi ou DXR, somente o sal MTT e, desta forma, consideradas 100% viáveis. O branco do teste foram os poços tratados somente com 100 µL de meio e 10 µL de MTT. Ao término do tempo de ± 2,5 horas de incubação, a placa foi centrifugada (Eppendorf Centrifuge 5810R) por 5 min a 3000 rpm em temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado por inversão da placa em bancada forrada com papel absorvente. Em seguida, adicionado 100 µL de DMSO puro e agitação da placa em agitador por 20 minutos protegida da luz. Foi realizada a leitura em espectrofotômetro Micronal B242 II em comprimento de onda 570 nm, sendo este ensaio realizado pelo menos cinco vezes.

3.4 Tratamento das Células HepG2 para o Ensaio do *Single-Cell Gel Electrophoresis* (Ensaio do cometa) e Análise das Lâminas

Os ensaios do cometa deste estudo são baseados nos protocolos de Singh et al. (1988) com adaptações técnicas a partir dos protocolos de Roberto (2009) e Tsuboy et al. (2007).

Células HepG2 em 5×10^5 células/mL foram semeadas e incubadas em 5 mL de meio completo, em frascos descartáveis de 25 cm² de área (Corning), em uma atmosfera de CO₂ de 5%, a 37 °C em estufa. Após 24 horas de incubação, a monocamada celular de HepG2 foi tratada com KCN diluído em meio completo (5,0; 15,0 e 25,0 µg/mL) ou folha (solução em meio completo) 5,0; 15,0 e 25,0 µg/mL ou

tucupi (solução em meio completo) 20,0; 40,0 e 60,0 µg/mL ou DXR (0,05 µg/mL), que foi escolhido como controle positivo a partir de ensaios prévios. O controle negativo foram células HepG2 em meio completo. Após o tratamento, as células foram novamente encubadas em uma atmosfera de CO₂ de 5%, a 37 °C em estufa por ± 3,5 horas. Passado este tempo, o meio de cada frasco foi reservado em tubos de centrífuga e a monocamada celular de cada frasco lavada duas vezes com PBS pH 7,4. Adicionou-se ± 1 mL de solução de uma enzima proteolítica, tripsina/EDTA (Cultilab – Brasil) em cada frasco, e os mesmos recolocados em atmosfera de CO₂ de 5%, a 37 °C por 5 minutos para desprendimento da monocamada celular da superfície interna do frasco pela degradação da matriz glicoproteica extracelular. Em seguida, a tripsina foi inativada pela adição de SBF em meio completo.

O conteúdo celular obtido foi centrifugado a 1500 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, restando ± 0,5 mL de meio, no qual o “pellet” foi ressuspenso. Aproximadamente 5 µL de suspensão celular foram homogeneizados em 5 µL de azul de tripano 0,25% (CAS 72-57-1 Sigma-Aldrich Co.). A solução resultante preencheu uma câmara de Neubauer para verificação da viabilidade celular em 100 células contadas. A incorporação do corante pelas células inviáveis, que não possuem membrana celular íntegra, torna as mesmas azuis ao microscópio de luz comum. Doutra forma, células viáveis, cujas membranas estão intactas, bloqueiam a penetração do corante, tornando-se transparentes na microscopia de luz. Pelo menos 70% de células devem ser viáveis para prosseguimento do ensaio do cometa.

Após a verificação da viabilidade celular utilizando azul de tripano, 20 µL da suspensão celular foram homogeneizados em 100 µL de solução de agarose (Sigma-Aldrich Co.) baixo ponto de fusão (LMP - “Low Melting fusion Point”) (0,5%) dissolvida em PBS, usada como uma matriz de gel quando a recuperação de fragmentos de DNA após a eletroforese é desejada. Lâminas, previamente cobertas com agarose de ponto de fusão normal (1,5%) e identificadas por códigos, foram montadas com ± 100 µL de suspensão celular em agarose LMP, sendo feito um total de duas lâminas para cada tratamento. Estas foram cobertas com lamínulas e levadas à geladeira (10°C) por 20 minutos. Decorrido este tempo, as lamínulas foram retiradas e as lâminas mantidas em cubetas (protegidas da luz) contendo solução de lise (1 mL de triton X-100, 10 mL de DMSO e 89 mL de solução de lise

estoque, pH 10,0 – solução estoque: 2,5 M de NaCl, 100 mM de EDTA, 10 mM de Tris, ~ 8,0 g de NaOH sólido) gelada, e mantidas em geladeira 10°C por 24 horas.

Após a lise, as lâminas foram dispostas em uma cuba horizontal de eletroforese e cobertas com solução tampão (300 mM de NaOH, 1 mM de EDTA, pH > 13) gelada 10°C e recém-preparada, por 20 minutos, para desnaturação do DNA. Após esse período, foi iniciada a corrida de eletroforese em corrente de 25 V/cm e 300 mA, por 20 minutos (corrente controlada com o volume de tampão). As lâminas foram, então, neutralizadas com 5 mL de solução tampão neutralizadora (0,4 M de Tris-HCl, pH 7,5), ± 10 minutos, secas na horizontal ± 1 hora e fixadas com etanol 100% ± 5 minutos. As lâminas foram deixadas à temperatura ambiente para secar ± 1 hora. Para análise dos nucleóides, as lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio a 2 µg/mL, preparada a partir de uma solução estoque (200 µg/mL), cobertas com lamínula e analisadas imediatamente à sua coloração.

Foram feitos três ensaios independentes e analisadas seis lâminas por tratamento, utilizando teste cego, ou seja, lâminas codificadas aleatoriamente e desta forma, 50 nucleóides por lâmina em um total de 300 nucleóides por tratamento, através da microscopia de fluorescência (Zeiss, Axiostarplus®) com filtro de excitação de 515-560 nm e filtro de barreira de 590 nm, em aumento de 400x. Duas análises foram feitas: visual e pelo software. Os nucleóides foram analisados e classificados visualmente, por uma única pessoa a fim de evitar diferenças bruscas nos resultados observados.

Os cometas foram classificados, de acordo com a migração dos fragmentos de DNA, em 5 classes: classe 0 (sem dano), classe 1 (pouco dano), classe 2 (médio dano), classe 3 (muito dano) e classe 4 (máximo de dano). Células com o núcleo completamente fragmentado, ou seja, em processo de morte celular, não foram contabilizadas. O índice de dano (ID) foi calculado segundo Collins (2004), usando a fórmula $DI = (0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, onde $n_0 - n_4$ representa o número de células com nível de dano de 0 – 4 (Figura 2). A observação dos danos nesse ensaio foi feita utilizando um software de domínio público de análises de imagens (CometScore, software; TriTek, Smerduck, VA, USA). O dano ao DNA foi quantificado pela porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in Tail*), o comprimento da

cauda x intensidade da cauda (*Tail moment*) e tamanho da cauda x fração de DNA total na cauda (*Olive moment*) (BOWDEN et al., 2003; TICE et al., 2000).



FIGURA 2: Fotomicrografia do dano celular em células HepG2. Os valores 0 a 4 foram determinados a partir da migração de fragmentos de DNA sob eletroforese para análise visual. Aumento original 400x, coloração Brometo de etídio 2 µg/mL.

3.5 Tratamento das Células HepG2 para o Ensaio do Citoma e Análise das Lâminas

O ensaio do citoma realizado nesse estudo foi baseado no protocolo de Fenech (2007) com adaptações técnicas dos protocolos a Chequer (2009), Tsuboy et al. (2007) e Valentin-Severin et al. (2003) que utilizaram células HepG2 em ensaios de mutagenicidade.

Após as 24 horas de cultivo celular de 5×10^5 células em 3 mL de meio completo em frascos descartáveis de 25 cm² de área (Corning) em estufa a 37 °C com 5% de CO₂, a monocamada celular de HepG2 foi tratada com folha (solução em meio completo) 5,0; 15,0 e 25,0 µg/mL ou tucupi (solução em meio completo) 20,0; 40,0 e 60,0 µg/mL de mandioca brava ou mansa sem ou com cozimento. O controle positivo usado foi DXR (0,05 µg/mL) e o controle negativo foram células HepG2 em meio completo. Após o tratamento as células foram novamente encubadas em uma atmosfera de CO₂ de 5%, a 37 °C em estufa por 20 horas. Após esse período, 60 µL da solução de citocalasina B de uso (CAS 14930-96-2 Sigma-Aldrich Co.) (concentração final no meio foi de 3,0 µg/mL) foram adicionados em cada frasco, a fim de bloquear a citocinese e as culturas novamente mantidas, por mais 28 horas, em estufa a 37 °C em uma atmosfera de CO₂ de 5% até a colheita, com tempo total de cultura de 72 horas.

As células foram lavadas duas vezes com 5 mL de PBS pH 7,4 e, após lavagem, solução de tripsina/EDTA em cada frasco foi adicionada. Os frascos foram levados para estufa por 5 minutos a 37° C em uma atmosfera rica m 5% de CO₂. Em seguida, a tripsina foi inativada pela adição do meio completo ocorrendo uma centrifugação em 1500 rpm por 5 minutos. Após centrifugação, o sobrenadante foi desprezado, restando ± 0,5 mL de meio, no qual “pellet” foi homogeneizado. Foram adicionados 5 mL de solução hipotônica de citrato de sódio (1%) gelada em cada frasco homogeneizando-os intensamente e a seguir 25 µL de formol, homogeneizando-os novamente. As células foram centrifugadas em 1500 rpm por 5 minutos, em seguida, o sobrenadante desprezado e, ao “pellet” acrescentado 5 mL de fixador (metanol/ácido acético 3:1), homogeneizando imediatamente. Após nova centrifugação (1500 rpm por 5 minutos), o sobrenadante foi retirado cuidadosamente utilizando-se uma pipeta Pasteur, deixando somente uma quantidade ± 0,5 mL. Em lâmina gelada, com filme d’água formado e mantida levemente inclinada, ± 50 µL da suspensão de células foram gotejados, espalhando o material uniformemente.

Foram realizados três ensaios independentes (n=3) e para cada tratamento foram confeccionadas duas lâminas. As lâminas foram codificadas aleatoriamente e acondicionadas em estantes próprias para secagem e após este período guardadas para análise. Na coloração das lâminas foi utilizado o corante laranja de acridina 40 µg/mL, imediatamente anterior à leitura da lâmina. As lâminas foram analisadas em teste cego, utilizando microscópio de fluorescência, em aumento de 400X. Para cada grupo experimental foram analisadas 500 células HepG2 classificadas como mono-, bi-, tri e tetranucleadas. Ainda, foram analisadas 1000 células binucleadas (BN) por ensaio, totalizando 3000 células BN por tratamento, quanto à presença dos biomarcadores de danos ao DNA (micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotos nucleares) (FIGURA 3). O Índice de Divisão Nuclear (NDI “Nuclear Division Index”) foi calculado de acordo com a fórmula $NDI = [M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$, onde M1 – M4, representam os números de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente e N o número total de células contadas.

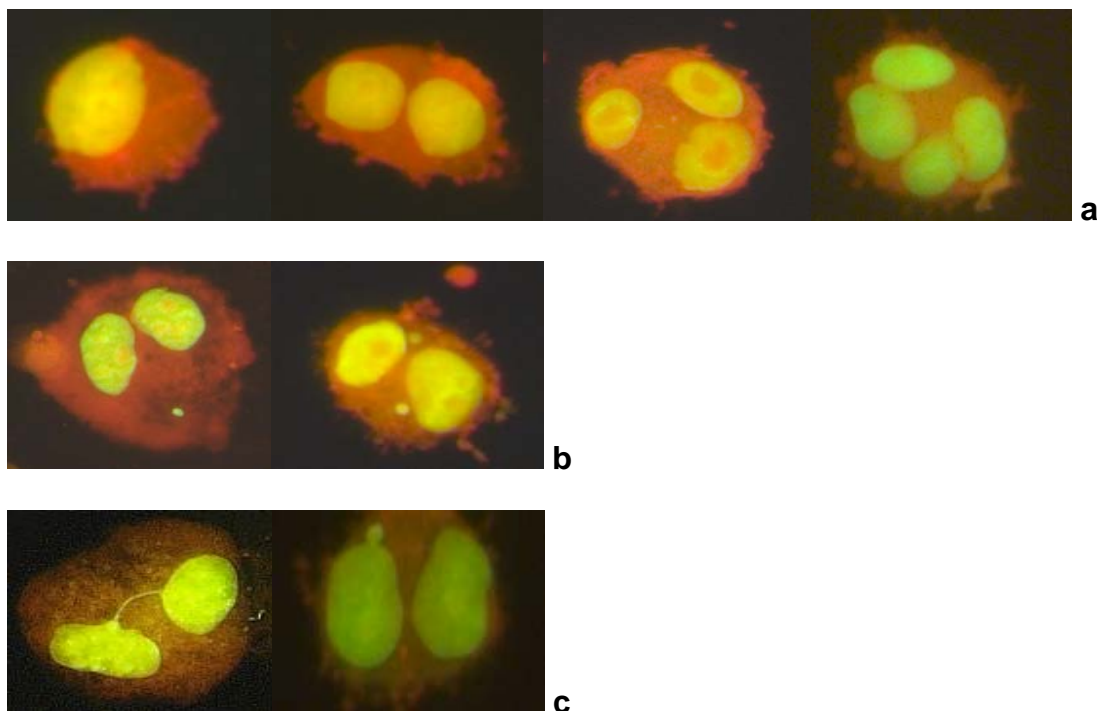


FIGURA 3: Fotomicrografia de células HepG2 para análise de micronúcleo (MN), ponte nucleoplasmática (NPB) e broto nuclear (NBUD). (a) Célula mononucleada, Célula binucleada, Célula trinucleada e Célula tetranucleada; (b) Célula binucleada com um MN e Célula binucleada com dois micronúcleos (MNs); (c) Célula binucleada com uma NPB, Célula binucleada com um NBUD. Aumento original 400x, coloração laranja de acridina 40 µg/mL.

3.6 Análises Estatísticas

Os ensaios foram feitos em triplicata e os resultados médios (média \pm desvio padrão) obtidos nesse estudo foram analisados com o auxílio do programa GraphPad Prism5[®] versão 5.0, por meio de estatística descritiva e análise de variância (ANOVA) paramétrica de normalidade, com pós-teste de comparações múltiplas de Tukey e, ainda nos ensaios do MTT, cometa e citoma, foram realizadas comparações entre as concentrações testadas e o controle negativo pelo teste de Dunnett. Em todas as análises foi adotado nível de significância $p < 0,05$ estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1 Determinação das Concentrações de Cianeto Total e Livre nas Amostras de Mandioca

Nesse estudo, a quantificação do CN⁻ nas folhas moídas e raízes prensadas (tucupi) de duas variedades de mandioca (brava e mansa) realizada, tanto em amostras sem cozimento quanto com cozimento, demonstram valores em mg/kg de CN⁻ total (Figuras 4 e 6) ou CN⁻ livre (Figuras 5 e 7). As dosagens de CN⁻ total incluíram a linamarina + acetonacianidrina + HCN e as de CN⁻ livre incluíram somente o HCN.

4.1.1 Determinação de Cianeto Total nas Folhas de Mandioca Brava e Mansa

As folhas cruas de mandioca da variedade brava apresentaram as menores concentrações de CN⁻ total (221,08 mg/kg de folha) em relação às folhas cruas de mandioca da variedade mansa (270,9 mg/kg de folha) ($p < 0,01$) (Figura 4).

As folhas de mandioca da variedade brava quando cozidas, apresentaram concentração de CN⁻ total maior (306,25 mg/kg de folha) em relação à mesma variedade quando crua (221,08 mg/kg de folha) e em relação às folhas cozidas de mandioca da variedade mansa (293,73 mg/kg de folha), porém com valores não estatisticamente significativos (Figura 4).

As folhas cozidas de mandioca da variedade mansa apresentaram concentração de CN⁻ total maior (293,73 mg/kg de folha) em relação à mesma variedade quando crua (270,9 mg/kg de folha), porém não estatisticamente significativo (Figura 4).

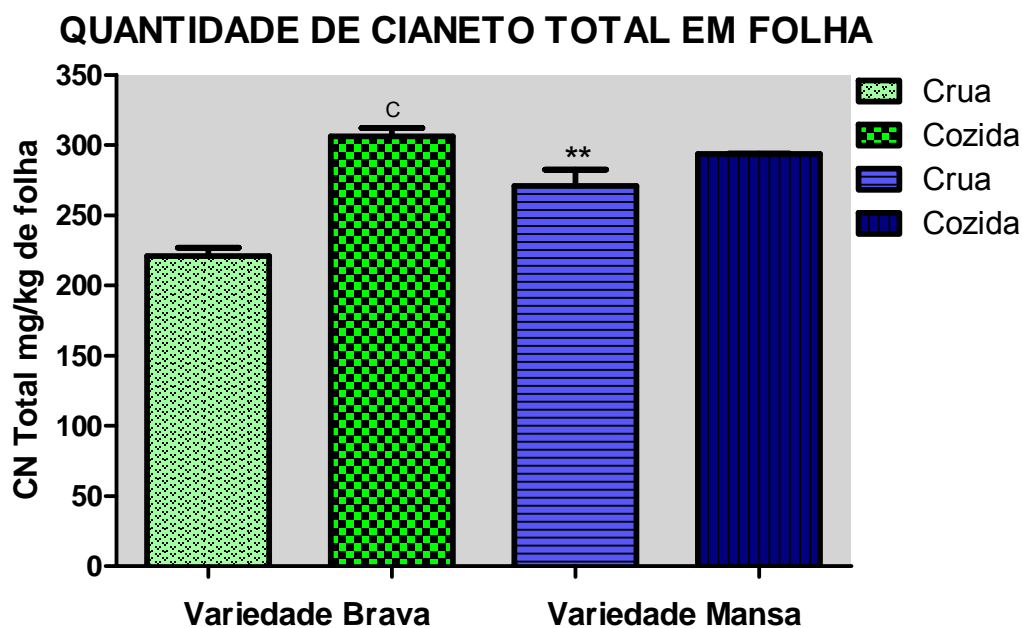


FIGURA 4: Quantidade de cianeto (CN^-) total (mg/kg de folha) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas. Resultados obtidos de três ensaios, sendo utilizado o teste de Tukey, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, $** = p < 0,01$ (comparação entre as variedades brava e mansa de mandioca crua) e $c = p < 0,001$ (comparação entre os grupos cru e cozido na variedade brava de mandioca).

4.1.2 Determinação de Cianeto Livre nas Folhas de Mandioca Brava e Mansa

A concentração de CN^- livre é menor que a concentração de CN^- total em ambas as variedades de mandioca. Porém foi superior nas folhas cruas de mandioca da variedade mansa (130,30 mg/kg de folha) em relação às folhas cruas de mandioca da variedade brava (56,64 mg/kg de folha), com valores estatisticamente significativos ($p < 0,001$) (Figura 5).

Após o cozimento, a concentração de CN^- livre foi extremamente inferior, tanto nas folhas de mandioca da variedade brava (1,20 mg/kg de folha) quanto nas folhas de mandioca da variedade mansa (3,71 mg/kg de folha) com valores estatisticamente significativos ($p < 0,001$) (Figura 5).

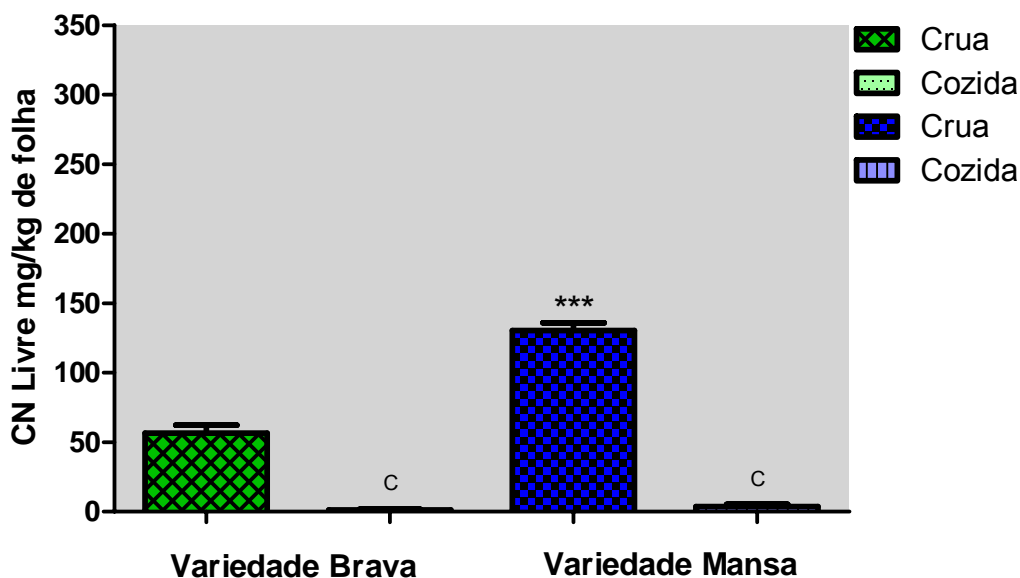
QUANTIDADE DE CIANETO (CN) LIVRE EM FOLHA

FIGURA 5: Quantidade de cianeto (CN⁻) livre (mg/kg de folha) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas. Resultados obtidos de três ensaios, sendo utilizado o teste de Tukey, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, *** = $p < 0,001$ (comparação entre as variedades brava e mansa de mandioca crua) e c = $p < 0,001$ (comparação entre os grupos cru e cozido na mesma variedade de mandioca).

4.1.3 Determinação de Cianeto Total no Tucupi de Mandioca Brava e Mansa

A concentração de CN⁻ total foi extremamente alta no tucupi cru de mandioca da variedade brava (1.789,10 mg/kg de tucupi) com valor estatisticamente significativo ($p < 0,001$) quando comparado ao tucupi cru de mandioca da variedade mansa (250,22 mg/kg de tucupi) (Figura 6).

Após o cozimento, a concentração de CN⁻ total no tucupi de mandioca da variedade brava diminuiu (587,12 mg/kg de tucupi) em relação à mesma variedade (1.789,10 mg/kg de tucupi) e também em relação ao tucupi cozido de mandioca da variedade mansa (25,72 mg/kg de tucupi), com valores estatisticamente significativos ($p < 0,001$) (Figura 6).

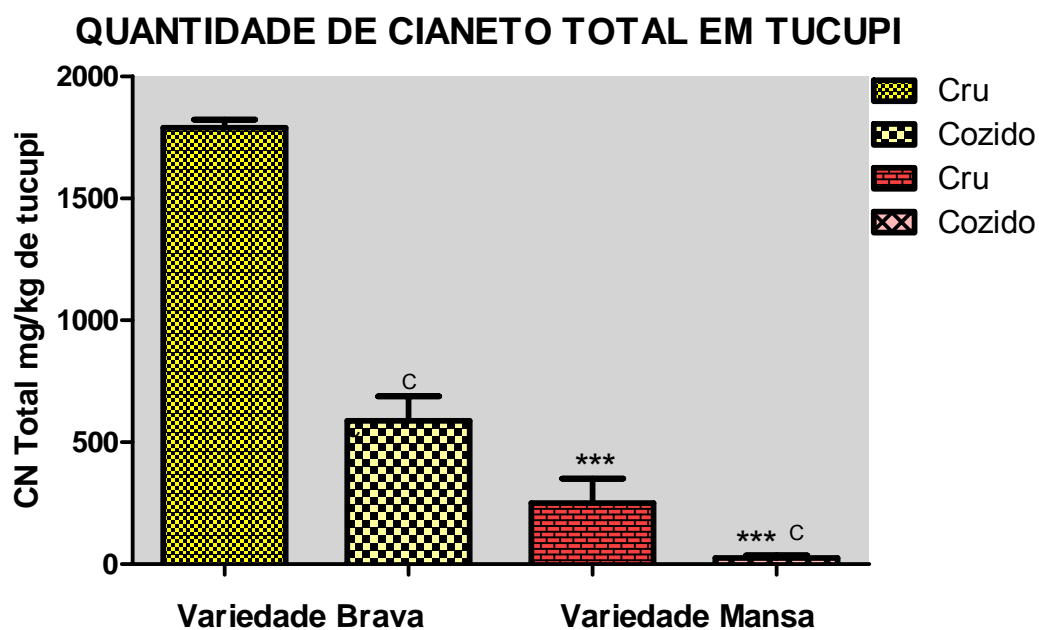


FIGURA 6: Quantidade de cianeto (CN⁻) total (mg/kg de tucupi) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas. Resultados obtidos de três ensaios, sendo utilizado o teste de Tukey, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, *** = $p < 0,001$ (comparação entre as variedades brava e mansa de mandioca) e c = $p < 0,001$ (comparação entre os grupos cru e cozido na mesma variedade de mandioca).

4.1.4 Determinação de Cianeto Livre no Tucupi de Mandioca Brava e Mansa

A concentração de CN⁻ livre também é menor que a concentração de CN⁻ total em ambas as variedades. Porém, foi superior no tucupi cru de mandioca da variedade brava (313,83 mg/kg de tucupi) em relação ao tucupi cru de mandioca da variedade mansa (27,06 mg/kg de tucupi) com valor estatisticamente significativo ($p < 0,001$) (Figura 7).

Após o cozimento, a concentração de CN⁻ livre diminuiu em ambas as variedades de mandioca, mas o tucupi de mandioca da variedade brava ainda apresentou valores superiores de CN⁻ livre (40,01 mg/kg de tucupi) em relação ao tucupi cozido de mandioca da variedade mansa (2,70 mg/kg de tucupi) com valor estatisticamente significativo ($p < 0,01$) (Figura 7).

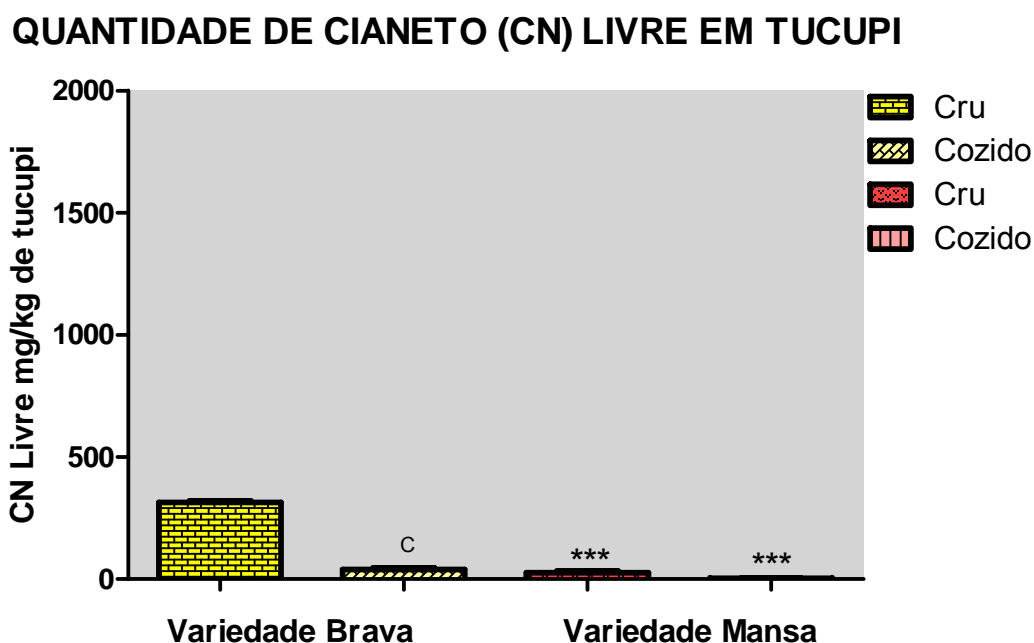


FIGURA 7: Quantidade de cianeto (CN⁻) livre (mg/kg de tucupi) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas. Resultados obtidos de três ensaios, sendo utilizado o teste de Tukey, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo, *** = $p < 0,001$ (comparação entre as variedades brava e mansa de mandioca) e c = $p < 0,001$ (comparação entre os grupos cru e cozido na variedade brava de mandioca).

4.2 Ensaios de Viabilidade Celular Em Células HepG2

4.2.1 Ensaios de Viabilidade Celular para Determinação da Concentração do Controle Positivo Doxorrubicina

A partir de dados da literatura, concentrações que variaram de 0,05 a 18,6 $\mu\text{g/mL}$ foram testadas no ensaio do MTT para determinar o efeito inibitório de DXR em células HepG2, em um tempo de 24 horas. As concentrações de DXR que obtiveram porcentagem de viabilidade celular em torno da IC_{50} foram de aproximadamente 0,6 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 8). A concentração escolhida para os ensaios seguintes de genotoxicidade e mutagenicidade foi de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que valores em torno de 0,6 $\mu\text{g/mL}$ não permitiram uma visualização microscópica clara dos danos celulares.

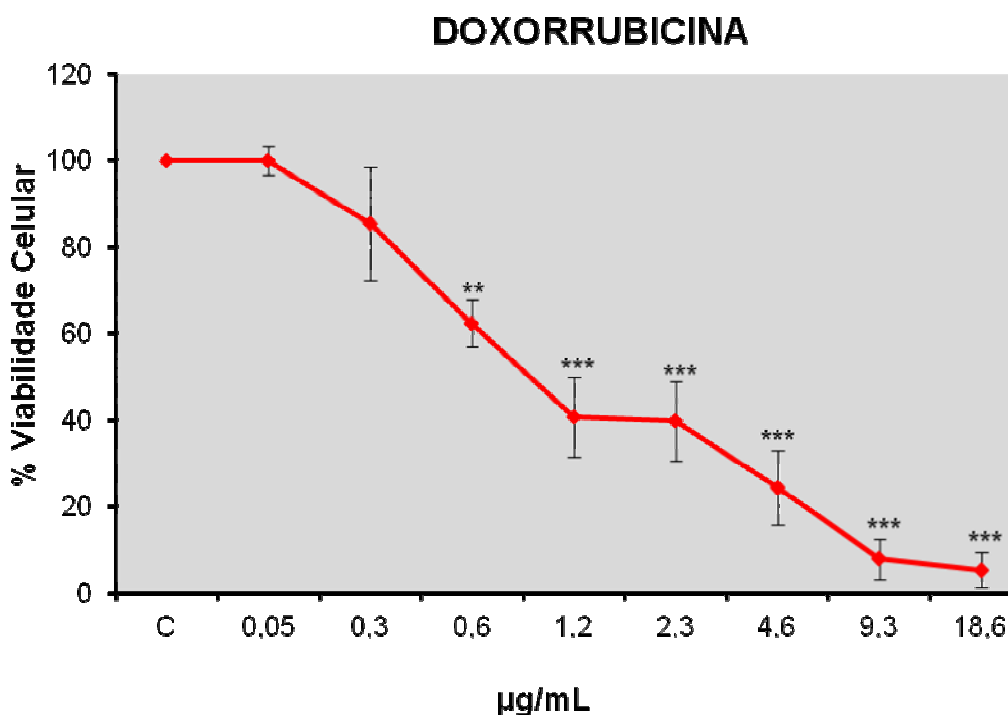


FIGURA 8: Citotoxicidade de Doxorubicina (DXR) em células HepG2 tratadas por 24 horas com concentrações de DXR que variaram de 0,05 a 18,6 µg/mL pelo ensaio do MTT. Resultados obtidos de três ensaios independentes, sendo utilizado o teste de Dunett, comparação feita entre cada concentração de DXR com o grupo controle (C), onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

4.2.2 Ensaios de Viabilidade Celular Para KCN

A viabilidade celular foi avaliada, utilizando o ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas com KCN em concentrações que variaram de 5,0 µg/mL a 17 mg/mL (Figura 9).

Nesse estudo, 73% de células viáveis foram observadas quando a concentração de 60,0 µg/mL de KCN foi utilizada. Já 1,7 mg/mL de KCN proporcionam aproximadamente 40% de células viáveis e com 17,0 mg/mL essa viabilidade não chegou a 15% (Figura 9). Concentrações acima de 17 mg/mL proporcionaram 100% de morte celular. Desta forma, os resultados obtidos no ensaio do MTT para o KCN revelaram que quanto maior a concentração utilizada menor a proporção de células viáveis.

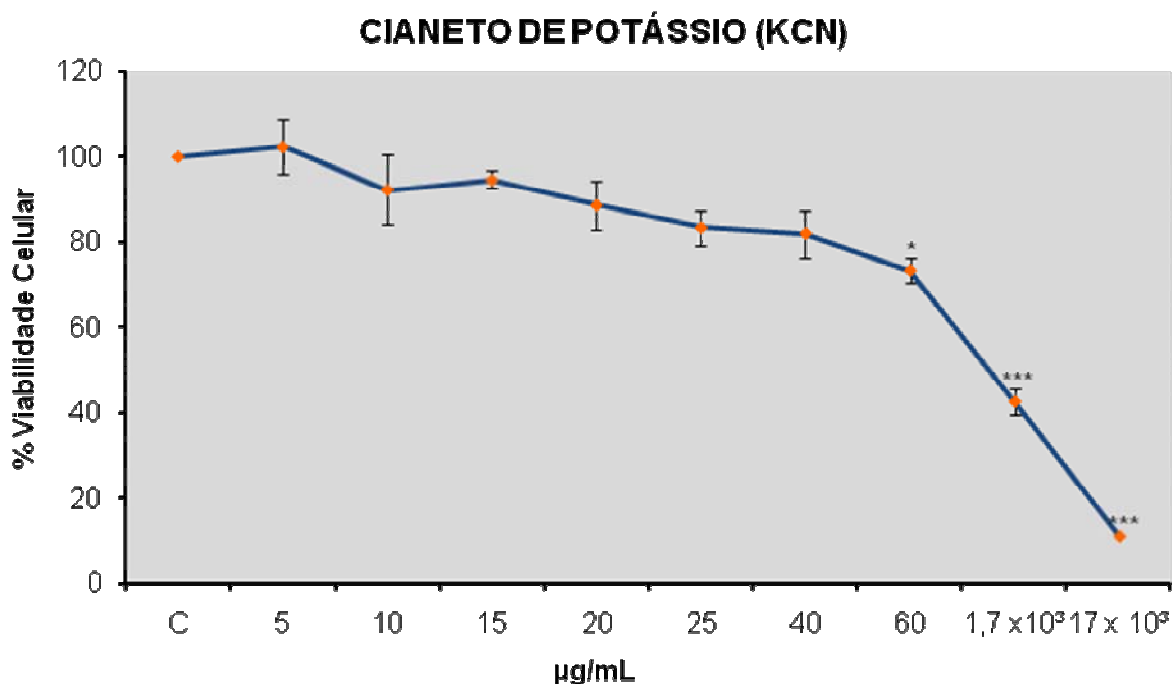


FIGURA 9: Citotoxicidade de KCN em células HepG2 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do agente pelo ensaio do MTT. Resultados obtidos de três ensaios independentes, sendo utilizados os testes de Dunett, comparação feita entre cada concentração de KCN com o grupo controle (C), onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$.

Os resultados de viabilidade celular obtidos para o KCN, depois de 24 horas de tratamento, foram comparados aos resultados de viabilidade celular obtidos pelo tratamento, também 24 horas, de células HepG2 com amostras de mandioca, tanto cruas quanto cozidas (Figura 10, 11, 12 e 13). A partir das comparações acima, concentrações ideais de KCN foram estabelecidas para os ensaios de genotoxicidade posteriores.

4.2.3 Ensaios de Viabilidade Celular Para as Amostras de Mandioca

4.2.3.1 Ensaio de Viabilidade Celular Para as Folhas de Mandioca Brava

Estudando o gráfico da figura 10 de viabilidade celular de KCN e de folhas cruas e cozidas de mandioca brava nas concentrações testadas (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 µg/mL), bem como, os dados estatísticos, percebe-se que o aumento na

concentração produziu uma diminuição na porcentagem de células vivas, mas somente 20,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$, em amostras cruas, comparadas ao grupo controle, obtiveram resultados estatisticamente significativos.

Após o cozimento das folhas de mandioca da variedade brava, concentrações de 5,0 e 10,0 $\mu\text{g/mL}$, produziram um aumento na porcentagem de células vivas. Por outro lado, as concentrações de 15,0; 20,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram valores de viabilidade celular menores que o grupo cru e estatisticamente significativos em relação ao grupo controle (Figura 10). Em relação ao KCN, apenas a concentração de 20 $\mu\text{g/mL}$ apresentou resultado estatisticamente significativo. Quando se compara concentrações iguais entre os grupos cru e cozido, não há diferença estatisticamente significativa (Figura 10).

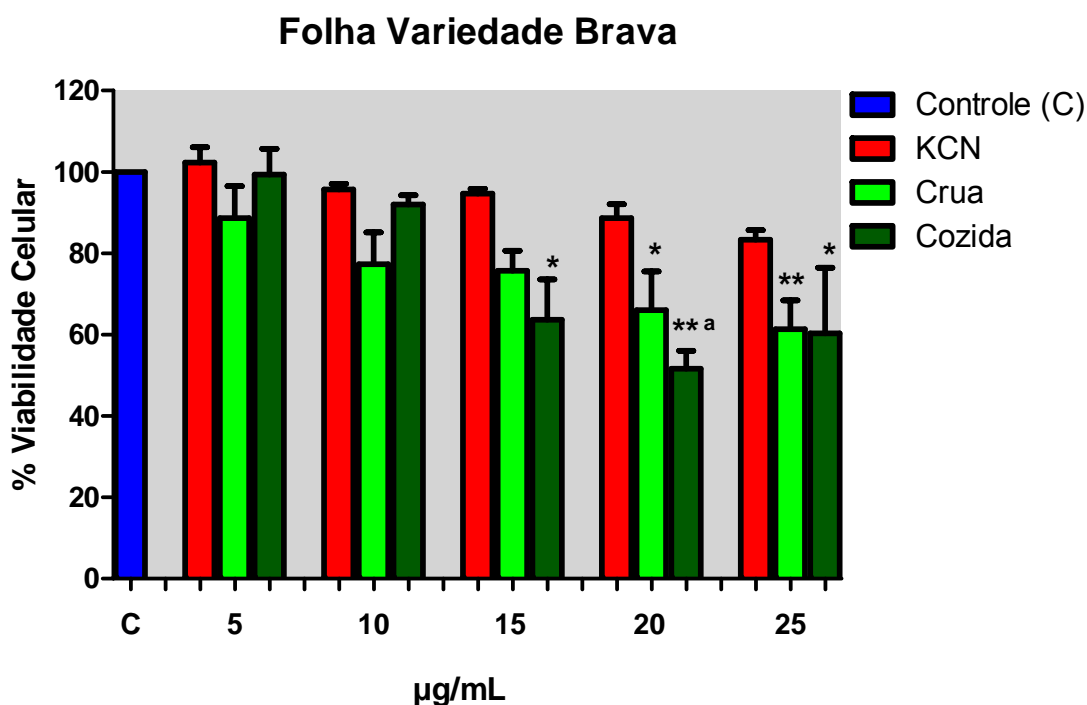


FIGURA 10: Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas por 24 horas com cinco concentrações KCN ou folhas de mandioca da variedade brava, cruas ou cozidas. Resultados obtidos de três ensaios independentes, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$ (comparação entre tratado e controle negativo (C) pelo teste de Dunett). ^a = $p < 0,05$ (Comparação entre mesmas concentrações de grupos tratado e KCN pelo teste de Tukey).

4.2.3.2 Ensaio de Viabilidade Celular Para as Folhas de Mandioca Mansa

De acordo com a figura 11, que reflete os valores de viabilidade celular de KCN e folhas da variedade de mandioca mansa, cruas e cozidas em cinco concentrações (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$) testadas no ensaio do MTT, o aumento da concentração para as amostras cruas induziu a diminuição na viabilidade celular, sendo que 15,0; 20,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$ demonstraram redução estatisticamente significativa na porcentagem de células viáveis, quando comparadas ao grupo controle (Figura 11).

Quando as folhas dessa variedade foram submetidas ao cozimento houve um pequeno aumento na porcentagem de células vivas, mas não estatisticamente significativo, tanto em relação ao grupo controle, quanto em relação ao grupo cru. Somente a concentração de 25 $\mu\text{g/mL}$ apresentou diferença estatística significativa em relação ao grupo controle (Figura 11). Nenhuma concentração, tanto do grupo cru quanto do grupo cozido, apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao KCN.

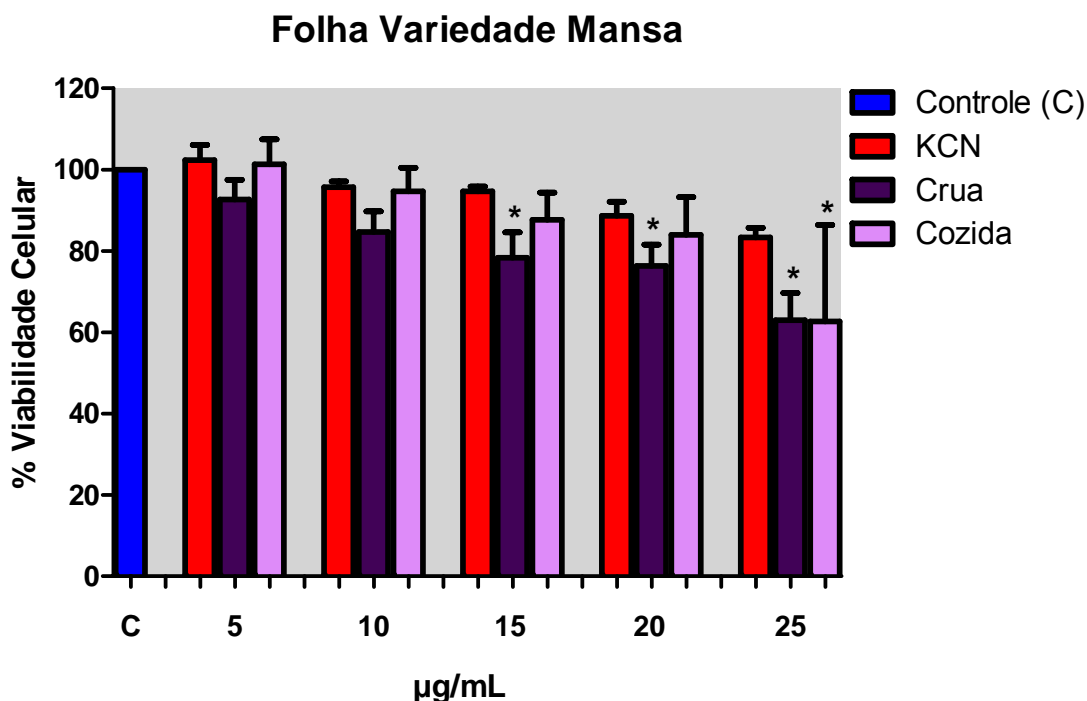


FIGURA 11: Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas por 24 horas com de cinco concentrações KCN ou folhas de mandioca da variedade mansa, cruas ou cozidas. Resultados obtidos de três ensaios independentes, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$ (comparação entre tratado e controle negativo (C) pelo teste de Dunett).

4.2.3.3 Ensaio de Viabilidade Celular Para o Tucupi de Mandioca Brava

Em relação à figura 12, que reflete os dados de viabilidade celular pertencentes ao KCN e às amostras de tucupi cru e cozido da variedade brava de mandioca nas concentrações 5,0; 10,0; 20,0; 40,0 e 60,0 $\mu\text{g/mL}$ em ensaio de MTT, somente as concentrações de 60,0 $\mu\text{g/mL}$ indicaram uma diminuição estatisticamente significativa em comparação ao grupo controle. Nenhuma concentração de tucupi, cru ou cozido, mostrou valores estatisticamente significativos em relação ao KCN (Figura 12).

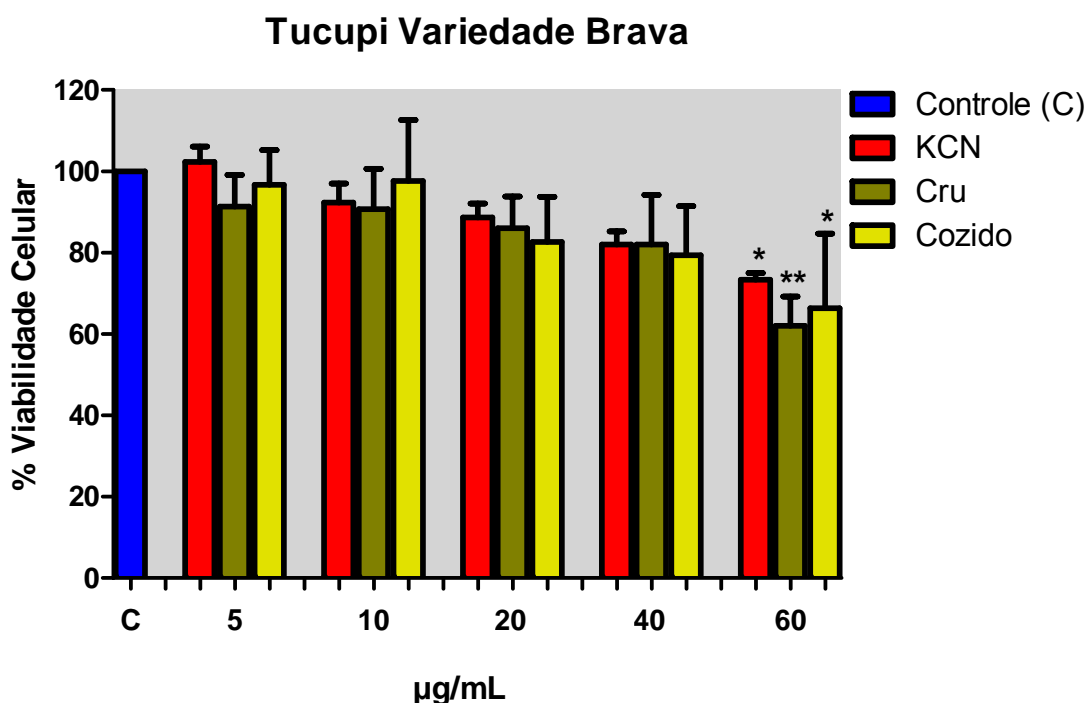


FIGURA 12: Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas por 24 horas com de cinco concentrações KCN ou tucupi de mandioca da variedade brava, cru ou cozido. Resultados obtidos de três ensaios independentes, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$ e ** = $p < 0,01$ (comparação entre tratado e controle negativo (C) pelo teste de Dunett).

4.2.3.4 Ensaio de Viabilidade Celular Para Tucupi de Mandioca Mansa

A figura 13 reflete os dados de viabilidade celular do KCN e tucupi, cru e cozido, da variedade mansa (5,0; 10,0; 15,0; 20,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$). Valores reduzidos de CN⁻ total no tucupi dessa variedade de mandioca não permitiram ensaios de viabilidade com concentrações maiores que 25,0 $\mu\text{g/mL}$. O aumento da concentração produziu queda na porcentagem de células vivas somente para as amostras cruas, porém apenas a concentração de 25,0 $\mu\text{g/mL}$ obteve valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle (Figura 13).

Após o cozimento das folhas dessa variedade, todas as concentrações aumentaram a porcentagem de células viáveis, mas não houve diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle ou quando os grupos, cru e cozido, na mesma concentração são comparados entre si ou ainda, quando comparados ao KCN (Figura 13).

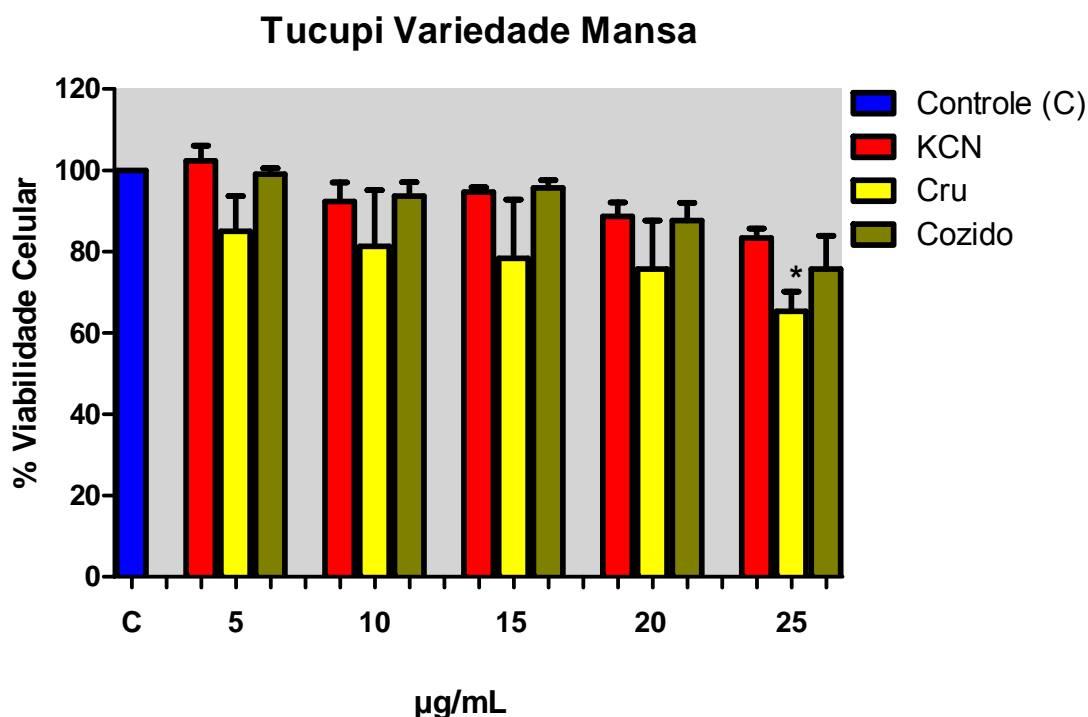


FIGURA 13: Viabilidade celular, determinada pelo ensaio do MTT, em células HepG2 tratadas por 24 horas com de cinco concentrações KCN ou tucupi de mandioca da variedade mansa, cru ou cozido. Resultados obtidos de três ensaios independentes, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$ (comparação entre tratado e controle negativo (C) pelo teste de Dunnett).

4.3 Ensaios de Genotoxicidade Utilizando o Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa foi realizado com KCN, folhas das variedades brava e mansa de mandioca, e tucupi da variedade brava, crus e cozidos, na determinação de uma possível genotoxicidade dessas variedades em células tumorais HepG2. Os valores reduzidos de CN⁻ total e livre em tucupi da variedade mansa não permitiram a utilização deste nos ensaios de genotoxicidade. A análise visual obedeceu a uma escala que variou de 0 a 4 de acordo com a intensidade da cauda (Figura 2), e com auxílio de um software foram feitas análises dos danos. As concentrações das amostras testadas tanto para o KCN quanto para as folhas foram 5,0; 15,0 e 25,0 µg/mL, já para o tucupi de mandioca da variedade brava foram 20,0; 40,0 e 60,0 µg/mL, embasadas nos testes de viabilidade celular. Os valores da análise visual são expressos nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

De acordo com a análise visual, células HepG2 tratadas com KCN nas três concentrações testadas apresentaram frequência de dano estatisticamente significativa quando comparadas ao grupo controle negativo ($p < 0,01$), chegando a 100% na concentração de 25,0 µg/mL, valor semelhante ao encontrado no controle positivo DXR. Quando os grupos tratados são comparados entre si, não há diferença estatisticamente significativa. Os valores de índice de dano foram altos para todas as concentrações de KCN testadas e os danos observados estão distribuídos principalmente nas classes 1 e 2 (Tabela 1).

TABELA 1: Índice de dano, frequência de dano e distribuição das classes de cometa obtidos pela análise visual de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de KCN^a

Tratamentos (µg/mL)	Classes					Índice de dano ± DP	Frequência de dano (%)
	0	1	2	3	4		
Controle Negativo	62	23	10	5	0	59,3 ± 11,08	38
DXR 0,05	0	7	12	28	53	327,0 ± 38,79	100**
KCN 5,0	2	55	22	14	7	167,3 ± 49,42	97**
KCN 15,0	1	44	47	6	2	163,0 ± 24,85	99**
KCN 25,0	0	20	58	19	3	205,0 ± 10,7	100**

DP = Desvio Padrão.

** = $p < 0,01$. Diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo).

^a 300 nucleóides foram analisados por tratamento. Para cada tratamento, 3 experimentos foram realizados. Valores apresentados em média.

HepG2 tratadas com folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava também apresentaram, independente do cozimento, mais de 70% de frequência de dano (Tabela 2). Quando comparadas ao grupo controle negativo, diferença estatisticamente significativa é encontrada diante das concentrações de 15,0 e 25,0 µg/mL de mandioca crua. Após o cozimento, a concentração de 15,0 µg/mL obteve uma frequência de dano de 99%, chegando bem próximo ao valor encontrado no grupo DXR (100%) e as diferenças estatisticamente significativas em relação ao grupo controle negativo ocorrem em todas as concentrações ($p < 0,05$). Quando os grupos, cru e cozido, são comparados entre si, não observamos diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 2). Os valores de índice de dano foram bem maiores nos grupos tratados que no grupo controle negativo (Tabela 2).

TABELA 2: Índice de dano, frequência de dano e distribuição das classes de cometa obtidos pela análise visual de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas cruas e cozidas de mandioca da variedade brava^a

Tratamentos (µg/mL)	Classes					Índice de dano ± DP	Frequência de dano (%)
	0	1	2	3	4		
Controle Negativo	62	23	10	5	0	59,3 ± 11,08	38
DXR 0,05	0	7	12	28	53	327,0 ± 38,79	100**
Crua 5,0	29	20	25	17	10	159,0 ± 94	71
Cozida 5,0	13	25	41	10	11	180,3 ± 11	87*
Crua 15,0	12	27	25	16	20	204,7 ± 69	88*
Cozida 15,0	1	16	34	14	35	265,3 ± 90	99**
Crua 25,0	12	32	38	14	04	164,3 ± 36	88*
Cozida 25,0	18	29	25	17	10	171,0 ± 78	82*

DP = Desvio Padrão.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo).

^a 300 nucleóides foram analisados por tratamento. Para cada tratamento, 3 experimentos foram realizados. Valores apresentados em média.

Na variedade mansa, a frequência de dano foi maior que 65% em todas as concentrações testadas, porém os tratamentos com folhas cruas não foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). O cozimento provocou um aumento na frequência de dano em todas as três concentrações testadas, sendo estatisticamente significativas em relação ao grupo controle negativo somente as concentrações de 5,0 e 25,0 $\mu\text{g/mL}$ de amostras de folhas cozidas ($p < 0,05$). Entre os grupos, cru e cozido, não houve diferença estatisticamente significativa. Os valores de índice de dano também foram maiores para os grupos tratados e DXR do que no grupo controle negativo (Tabela 3).

TABELA 3: Índice de dano, frequência de dano e distribuição das classes de cometa obtidos pela análise visual de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas cruas e cozidas de mandioca da variedade mansa^a

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	Classes					Índice de dano \pm DP	Frequência de dano (%)
	0	1	2	3	4		
Controle Negativo	62	23	10	5	0	59,3 \pm 11,08	38
DXR 0,05	0	7	12	28	53	327,0 \pm 38,79	100**
Crua 5,0	32	11	19	24	13	176,66 \pm 83,22	68
Cozida 5,0	7	12	27	21	32	258,00 \pm 60,40	93*
Crua 15,0	28	16	18	17	22	187,66 \pm 88,26	72
Cozida 15,0	21	20	29	13	17	185,00 \pm 77,68	79
Crua 25,0	25	33	26	11	5	138,00 \pm 58,44	75
Cozida 25,0	14	21	26	20	18	206,66 \pm 36,44	86*

DP = Desvio Padrão.

* = $p < 0,05$. Diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo).

^a 300 nucleóides foram analisados por tratamento. Para cada tratamento, 3 experimentos foram realizados. Valores apresentados em média.

Nas amostras de tucupi da variedade brava de mandioca, a frequência de dano aumentou de modo estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo nas três concentrações testadas ($p < 0,05$) e ($p < 0,001$). O cozimento do tucupi dessa variedade não foi eficaz na redução da frequência de dano, permitindo ainda valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) e ($p < 0,001$). O índice de dano nas três concentrações testadas, independente do cozimento também foi alto, todavia, o grupo DXR apresentou o maior índice de dano (327,0) (Tabela 4).

TABELA 4: Índice de dano, frequência de dano e distribuição das classes de cometa obtidos pela análise visual de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de tucupi cru e cozido de mandioca da variedade brava^a

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	Classes					Índice de dano \pm DP	Frequência de dano (%)
	0	1	2	3	4		
Controle Negativo	62	23	10	5	0	59,3 \pm 11,08	38
DXR 0,05	0	7	12	28	53	327,0 \pm 38,79	100**
Cru 20,0	8	30	30	14	19	206,33 \pm 37,93	92.3**
Cozido 20,0	4	27	43	22	4	196,00 \pm 31,87	96**
Cru 40,0	18	20	28	17	16	193,66 \pm 78,80	82*
Cozido 40,0	14	31	44	8	3	156,33 \pm 24,72	86*
Cru 60,0	2	26	40	22	10	210,66 \pm 45,05	98**
Cozido 60,0	9	44	29	10	8	164,33 \pm 27,81	91**

DP = Desvio Padrão.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$. Diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunnett ($p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo).

^a 300 nucleóides foram analisados por tratamento. Para cada tratamento, 3 experimentos foram realizados. Valores apresentados em média.

As análises das amostras de mandioca pelo software cometscore apresentaram dados não tão similares aos observados na análise visual, como mostrados nas figuras 14, 15, 16 para porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in Tail*), 17, 18, 19 para o comprimento da cauda x intensidade da cauda (*Tail moment*) e 20, 21 e 22 para tamanho da cauda x fração de DNA total na cauda (*Olive moment*). Os resultados de % DNA *in Tail*, *Tail moment* e *Olive moment* para as amostras de KCN são apresentados na tabela 5.

TABELA 5: Porcentagem de DNA na cauda, *Olive moment* e *Tail moment* obtidas por análise de software em células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de KCN^a

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	% DNA \pm DP	<i>Tail moment</i> \pm DP	<i>Olive moment</i> \pm DP
Controle Negativo	3,93 \pm 0,38	4,16 \pm 0,09	3,77 \pm 0,40
DXR 0,05	9,74 \pm 0,53**	10,25 \pm 1,94*	4,36 \pm 0,14
KCN 5,0	12,53 \pm 1,04***	3,36 \pm 0,95	4,97 \pm 0,55
KCN 15,0	13,14 \pm 1,22***	3,82 \pm 0,61	4,77 \pm 0,83
KCN 25,0	12,74 \pm 2,95***	6,28 \pm 2,09	4,89 \pm 0,95

DP = Desvio Padrão.

* = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$. Diferença significativa em relação ao grupo controle pelo teste de Dunett ($p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo).

^a 300 nucleóides foram analisados por tratamento. Para cada tratamento, 3 experimentos foram realizados. Valores apresentados em média.

Analisando a tabela 5, a porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in Tail*) das amostras de KCN em células HepG2, observa-se que todas as concentrações testadas aumentaram essa porcentagem apresentando resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle ($p < 0,001$). Por outro lado, os valores médios obtidos das análises de *Tail moment* e *Olive moment* revelaram valores estatisticamente não significativos em relação ao grupo controle ($p > 0,05$). Em todos os três parâmetros estudados, as três concentrações, quando comparadas entre si, não revelaram resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$).

Na observação da figura 14, de folhas da variedade brava, todas as concentrações testadas das amostras cruas aumentaram a porcentagem de DNA na cauda, mas apenas a concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ da amostra crua obteve resultados estatisticamente significativos em comparação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). O aquecimento proporcionou a diminuição dos valores de porcentagem de DNA na cauda em todas as concentrações testadas, mas não estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Por outro lado, diferença estatisticamente significativa foi vista entre as amostras cozidas e o KCN em todas as concentrações ($p < 0,05$ e $p < 0,01$). O controle positivo DXR apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,01$) (Figura 14).

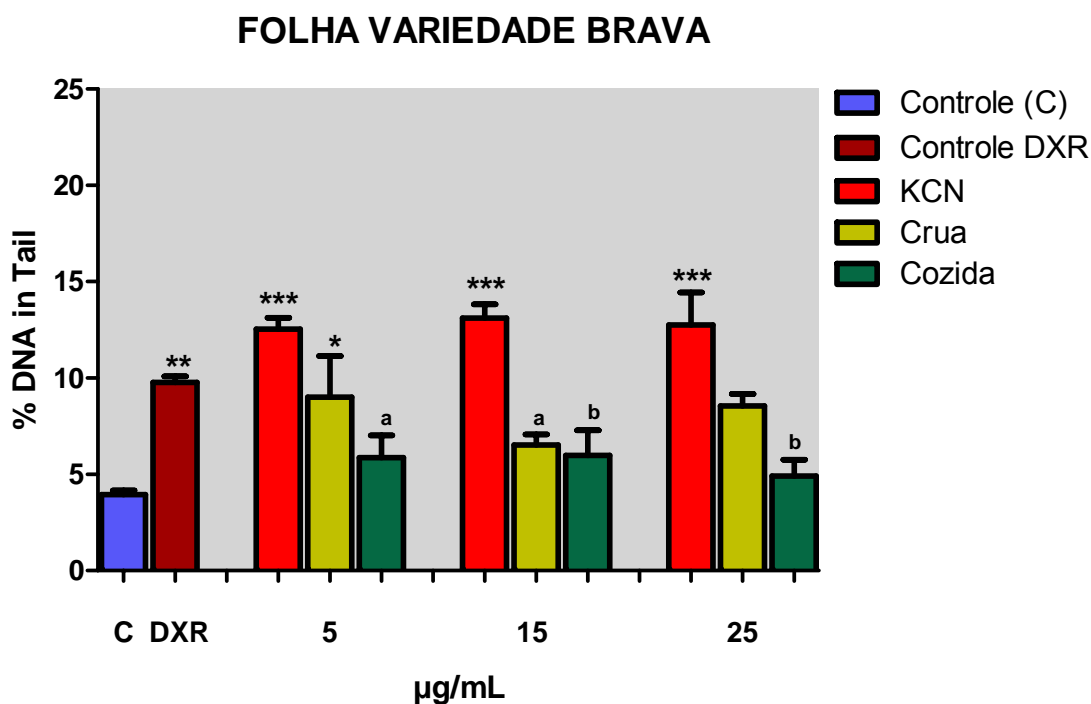


FIGURA 14: Porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in Tail*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folha cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$ (comparação entre tratado e controle negativo (C) pelo teste de Dunett). ** = $p < 0,01$ (comparação entre DXR e C pelo teste de Dunett). *** = $p < 0,001$ (comparação entre KCN e C pelo teste de Dunett). ^a = $p < 0,05$ (comparação entre tratado e KCN na mesma concentração pelo teste de Tukey). ^b = $p < 0,01$ (comparação entre tratado e KCN na mesma concentração pelo teste de Tukey).

Observando as análises da porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in Tail*) para as amostras de folhas da variedade mansa de mandioca (Figura 15), todas as concentrações das amostras cruas elevaram essa porcentagem, mas somente 15,0 µg/mL da amostra crua apresentaram resultado estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$). Quando submetidas ao cozimento, houve redução dos valores de porcentagem de DNA na cauda somente para a concentração de 15 µg/mL, e nenhuma concentração foi diferente do controle negativo de modo estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Comparando mesmas concentrações dos grupos tratados com KCN, apenas 5 µg/mL de amostra crua e 15 µg/mL de amostra cozida obtiveram valores estatisticamente significativos ($p < 0,05$). O grupo controle DXR apresentou diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,01$) (Figura 15).

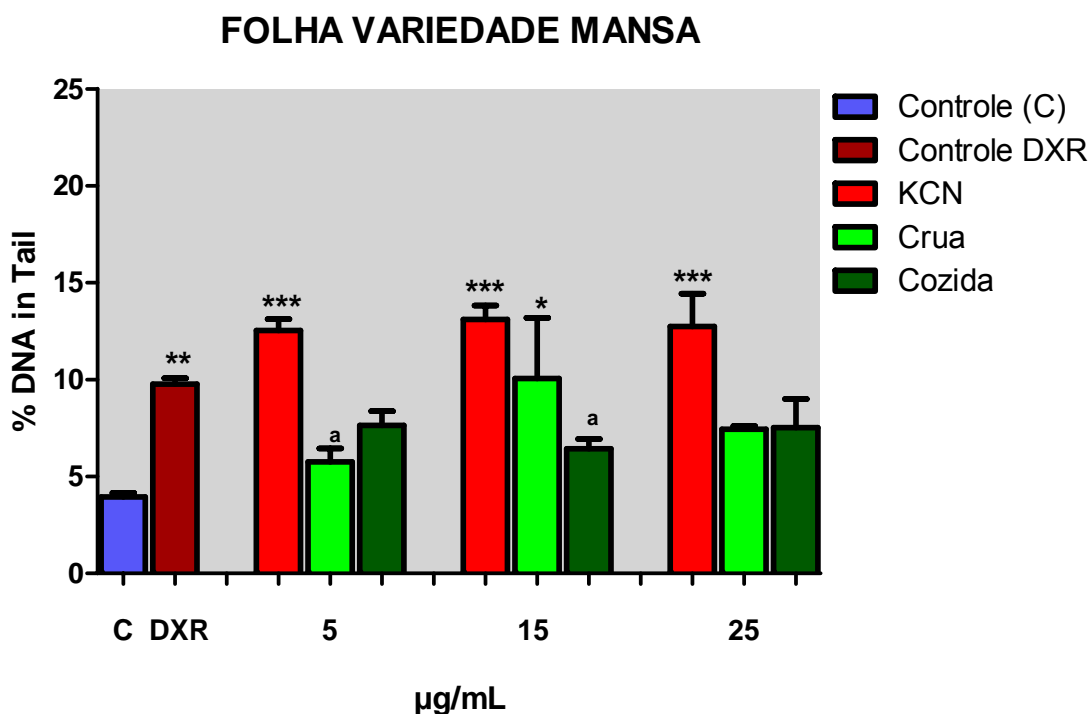


FIGURA 15: Porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in Tail*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folha cruas ou cozidas de mandioca da variedade mansa. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$ (comparação entre tratado e controle negativo (C) pelo teste de Dunett). ** = $p < 0,01$ (comparação entre DXR e C pelo teste de Dunett). *** = $p < 0,001$ (comparação entre KCN e C pelo teste de Dunett). ^a = $p < 0,05$ (comparação entre tratado e KCN na mesma concentração pelo teste de Tukey).

Observando a figura 16 que reflete a porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in Tail*) para as amostras de tucupi da variedade brava de mandioca, todas as concentrações das amostras, tanto cruas quanto cozidas, aumentaram a porcentagem de DNA na cauda, mas nenhum valor foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Com o cozimento, a porcentagem de DNA na cauda aumentou discretamente somente na concentração de 40,0 $\mu\text{g/mL}$, porém não estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Os resultados para o grupo DXR foram estatisticamente significativos em relação ao controle negativo ($p < 0,01$) (Figura 16).

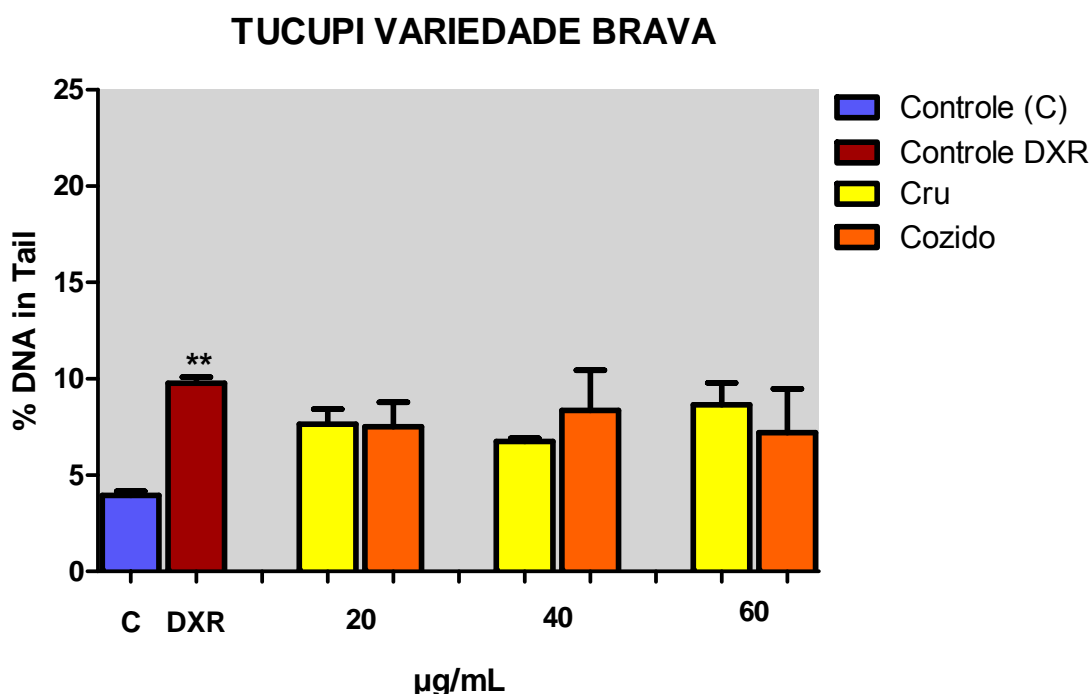


FIGURA 16: Porcentagem de DNA na cauda (% DNA *in Tail*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou tucupi cru ou cozido de mandioca da variedade brava. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. ** = $p < 0,01$ (comparação entre DXR e controle negativo (C) pelo teste de Dunnett).

Na análise de *Tail moment* das folhas da variedade brava de mandioca (Figura 17), todas as concentrações das amostras, cruas ou cozidas, aumentaram os valores de *Tail moment*. Diferença estatisticamente significativa em relação ao grupo controle negativo foram vistas em todas as concentrações da amostra crua (p

< 0,05; $p < 0,01$ e $p < 0,001$) e somente na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ da amostra cozida ($p < 0,01$). Na comparação com o KCN, somente a concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de amostra, tanto crua quanto cozida, apresentou resultado estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p < 0,05$). Os valores de DXR foram estatisticamente significativos em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 17).

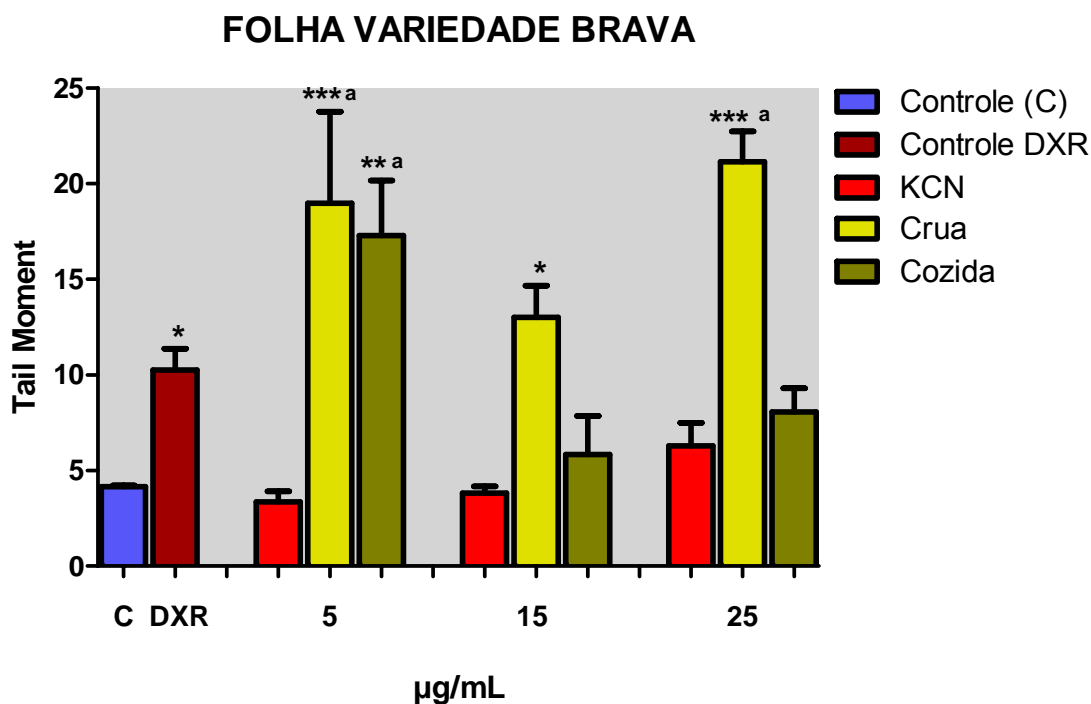


FIGURA 17: Produto do comprimento da cauda *versus* intensidade relativa da cauda (*Tail moment*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$ (comparação entre DXR e controle negativo (C) pelo teste de Dunett) ** = $p < 0,01$ e *** = $p < 0,001$ (comparação entre tratado e C pelo teste de Dunett). ^a = $p < 0,05$ (comparação entre tratado e KCN na mesma concentração pelo teste de Tukey).

Nas análises de *Tail moment* das folhas da variedade mansa de mandioca, somente 15,0 $\mu\text{g/mL}$ da amostra crua aumentaram os valores de *Tail moment* com diferença estatística significativa em relação ao controle negativo ($p < 0,05$) e em relação ao grupo KCN na mesma concentração ($p < 0,05$). As demais concentrações obtiveram valores próximos aos observados no grupo controle negativo. O grupo

DXR obteve valores estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 18).

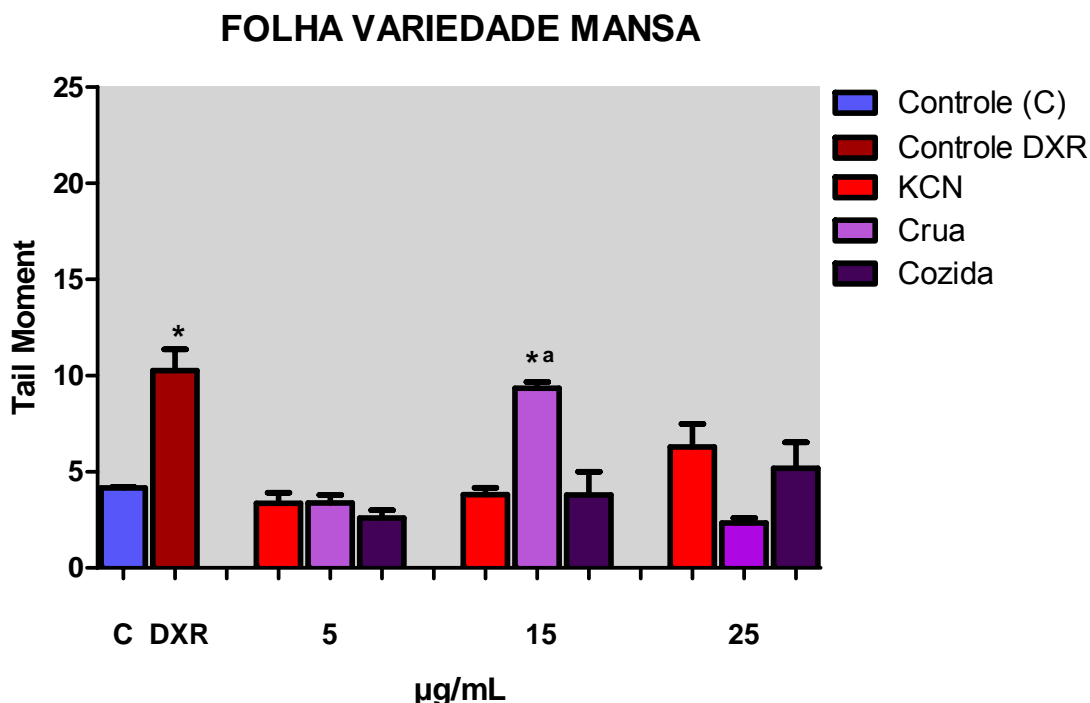


FIGURA 18: Produto do comprimento da cauda *versus* intensidade relativa da cauda (*Tail moment*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade mansa. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo. * = $p < 0,05$ (comparação entre tratado ou DXR e controle negativo (C) pelo teste de Dunett). ^a = $p < 0,05$ (comparação entre tratado e KCN na mesma concentração pelo teste de Tukey).

Já as análises de *Tail moment* de tucupi da variedade brava de mandioca mostram que todas as concentrações de tucupi testadas, tanto cru quanto cozido, não apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Por outro lado, o controle DXR apresentou valores de *Tail moment* estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo ($p < 0,05$) (Figura 19).

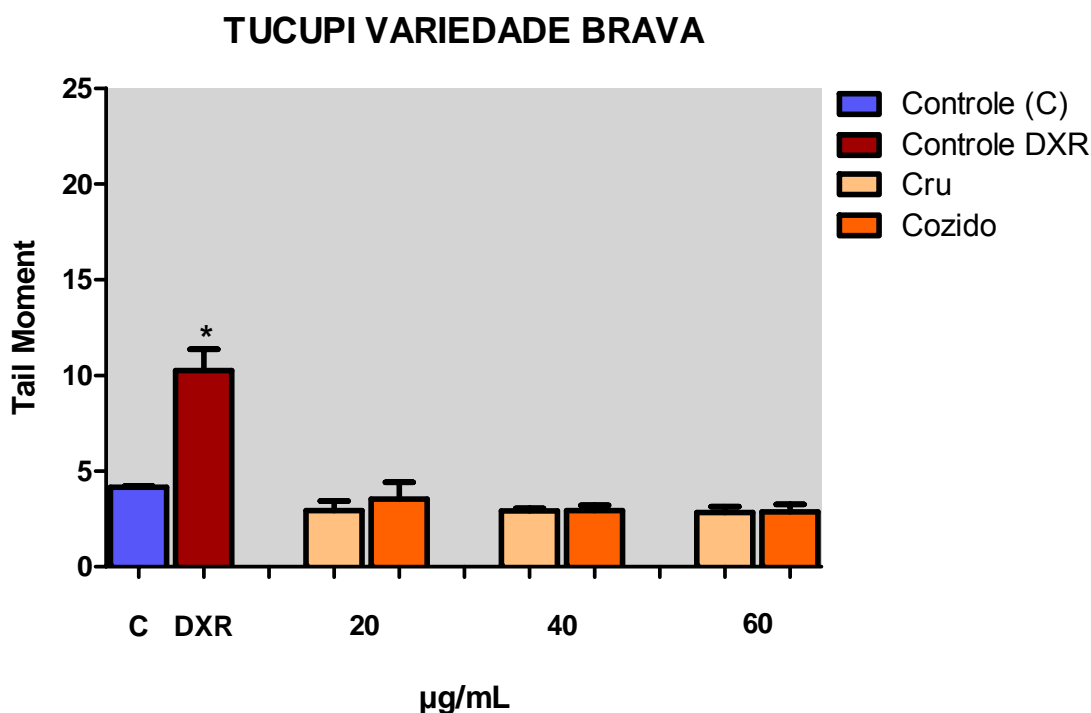


FIGURA 19: Produto do comprimento da cauda *versus* intensidade relativa da cauda (*Tail moment*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de tucupi cru ou cozido de mandioca da variedade brava. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Já nas análises de *Olive moment* para folhas de mandioca da variedade brava (Figura 20), todas as concentrações das amostras cruas aumentaram os valores de *Olive moment*. O cozimento produziu diminuição nesses valores, os quais foram menores que valores encontrados no grupo controle negativo, mas nenhum resultado foi estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ou ao KCN ($p > 0,05$). Quando comparados entre si, os grupos cru e cozido nas mesmas concentrações, não revelaram resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$). Da mesma forma, o grupo DXR também não apresentou resultados de *Olive moment* estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$) (Figura 20).

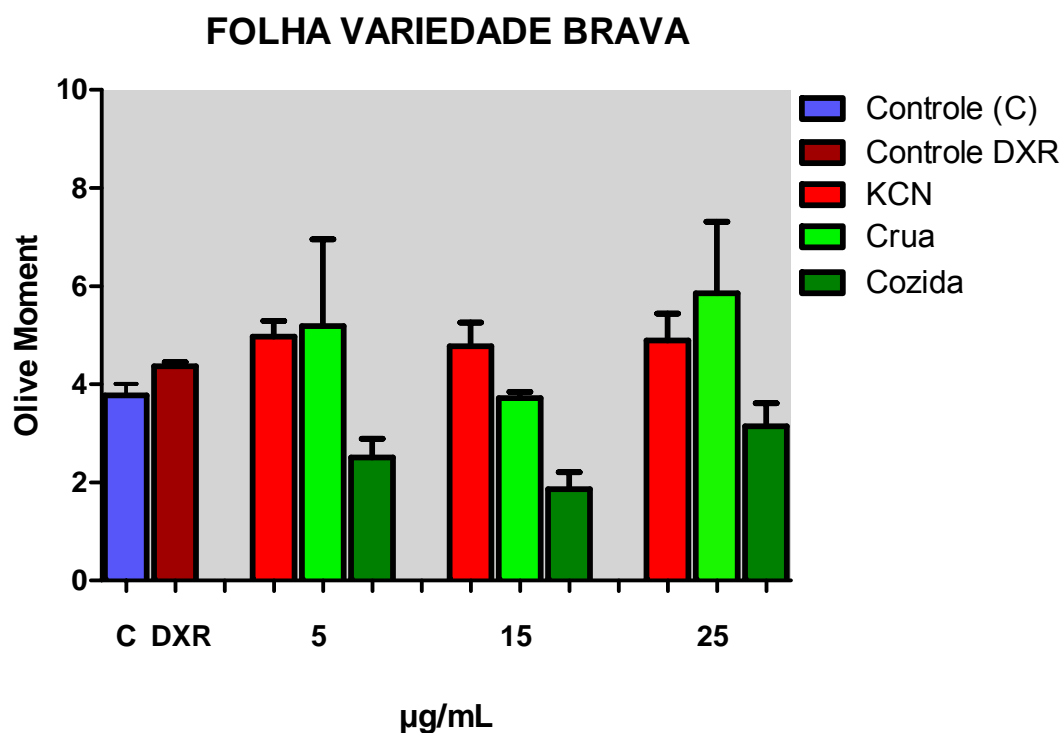


FIGURA 20: Produto do comprimento da cauda *versus* fração de DNA na cauda (*Olive moment*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Já nas análises de *Olive moment* para as folhas de mandioca da variedade mansa (Figura 21) as concentrações de 5,0 e 15,0 µg/mL da amostra crua aumentaram os valores de *Olive moment*, porém com valores estatisticamente não significativos em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Quando submetidas ao cozimento, essas mesmas concentrações diminuíram os valores de *Olive moment*, porém não estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Já a concentração de 25,0 µg/mL da amostra cozida aumentou os valores de *Olive moment* em relação ao grupo controle negativo, mas também com valores estatisticamente não significativos ($p > 0,05$). Nenhuma concentração mostrou resultados diferentes estatisticamente do grupo KCN ($p > 0,05$). Quando comparados entre si, os grupos, cru e cozido, nas mesmas concentrações, não revelaram resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$). O grupo DXR

também não mostrou resultados de *Olive moment* estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$) (Figura 21).

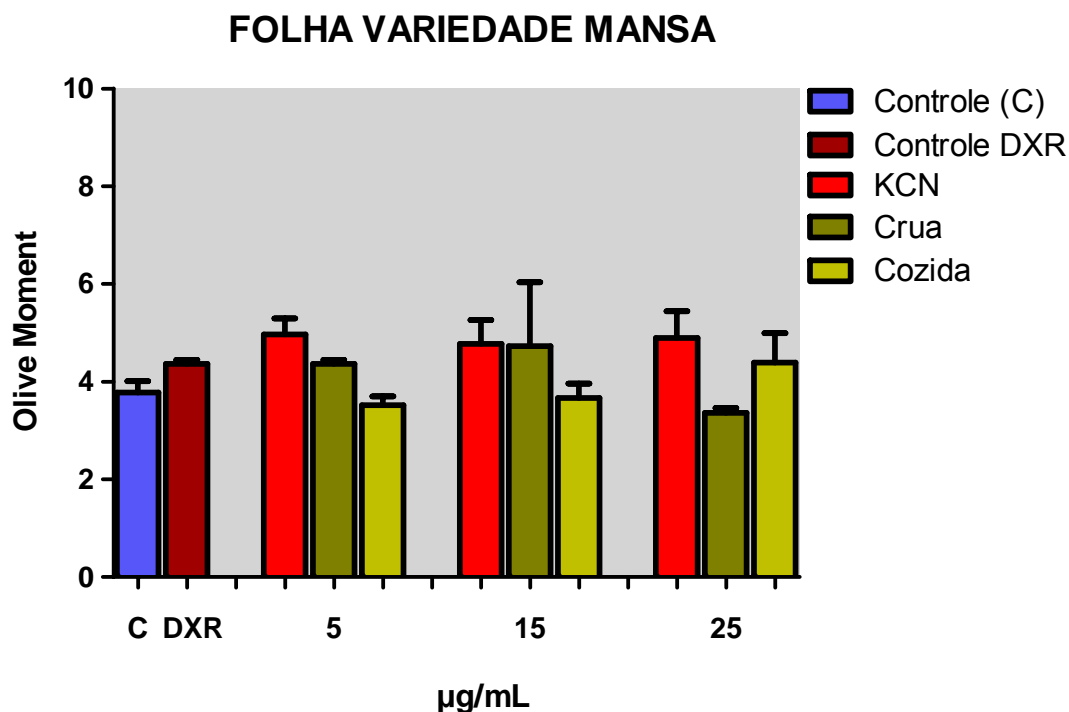


FIGURA 21: Produto do comprimento da cauda *versus* fração de DNA na cauda (*Olive moment*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de KCN ou folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade mansa. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

Os valores de *Olive moment* para as amostras de tucupi de mandioca da variedade brava (Figura 22) foram próximos aos observados no grupo controle negativo e, desta forma, não diferentes estatisticamente ($p > 0,05$). Quando são comparadas mesmas concentrações dos grupos cru e cozidos, valores também estatisticamente não significativos foram observados ($p > 0,05$). Os valores de *Olive moment* para o grupo DXR também não foram estatisticamente significativos em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$) (Figura 22).

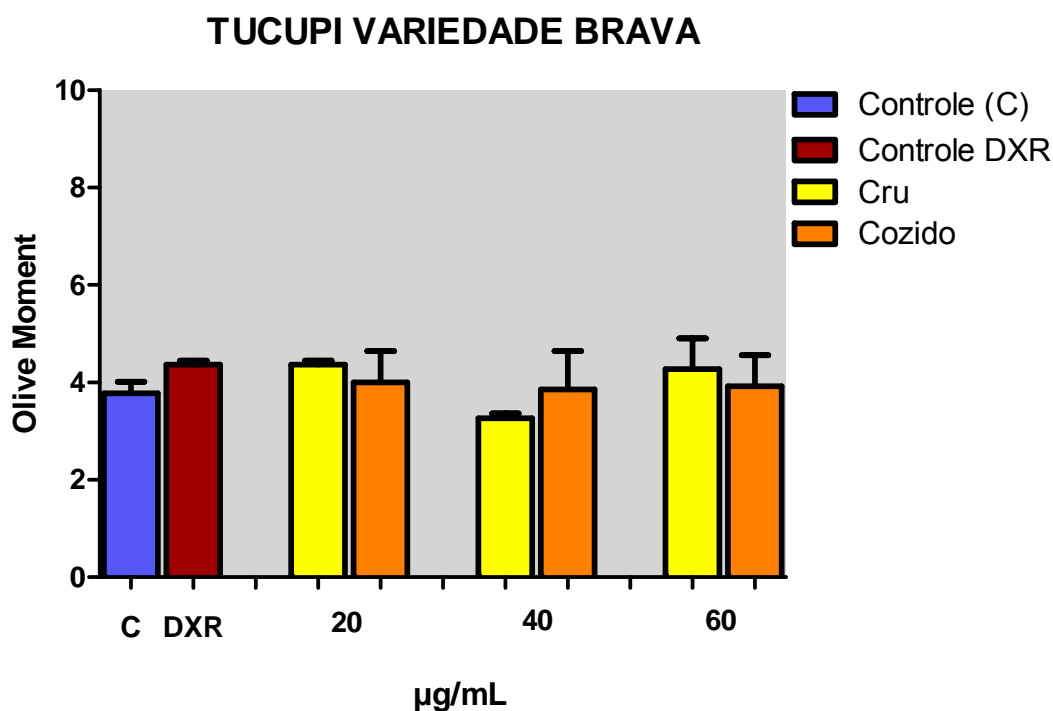


FIGURA 22: Produto do comprimento da cauda *versus* fração de DNA na cauda (*Olive moment*) pelo ensaio do cometa realizado em células HepG2 tratadas com três concentrações de tucupi cru ou cozido de mandioca da variedade brava. Resultados obtidos de três ensaios independentes, com análise de 100 nucleóides por experimento, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

4.4 Ensaios de Mutagenicidade Utilizando o Ensaio do Citoma

O ensaio do citoma foi realizado com folhas das variedades brava e mansa de mandioca, e tucupi da variedade brava, crus e cozidos, na determinação de uma possível mutagenicidade dessas variedades em células tumorais HepG2. Os valores reduzidos de CN⁻ total e livre em tucupi da variedade mansa não permitiram sua utilização neste ensaio.

As Tabelas 6, 7 e 8 apresentam os dados de distribuição de células de acordo com o número de núcleos, a porcentagem de células binucleadas e o Índice de Divisão nuclear (NDI “Nuclear Division Index”) em células HepG2 tratadas com folhas de mandioca da variedade brava, folhas de mandioca da variedade mansa e tucupi de mandioca da variedade brava, respectivamente. As concentrações das amostras testadas foram 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 µg/mL, sendo que todas obtiveram um número suficiente de células binucleadas para a análise da frequência de

biomarcadores de danos ao DNA. O controle positivo utilizado nesse ensaio foi DXR na concentração de 0,05 $\mu\text{g/mL}$, uma vez que concentrações maiores de DXR inviabilizaram a contagem do número de células binucleadas. Os resultados da análise do NDI mostraram que os grupos tratados não resultaram em diferenças estatísticas significativas quando comparados ao grupo controle negativo ($p > 0,05$).

TABELA 6: Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, Porcentagem (%) de células binucleadas e Índice de Divisão Nuclear (NDI) em culturas de células HepG2 tratadas com folhas cruas ou cozidas de mandioca da variedade brava^a

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos				% Células binucleadas	NDI
	1	2	3	4		
Controle Negativo	763	702	27	8	46,8	1,52
DXR 0,05	634	816	35	15	54,4	1,62
Crua 0,1	806	659	29	6	43,9	1,49
Cozida 0,1	836	630	23	11	42,0	1,47
Crua 0,5	847	607	37	9	40,6	1,47
Cozida 0,5	812	665	18	5	44,3	1,47
Crua 1,0	767	703	23	7	46,9	1,51
Cozida 1,0	893	584	18	5	38,9	1,42
Crua 5,0	902	575	17	6	38,3	1,42
Cozida 5,0	928	551	19	2	36,7	1,39

^a Para cada experimento ($n=3$) foi analisada 1 lâmina (500 células por lâmina) totalizando 1500 células analisadas. $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo (Comparação entre tratados e controle negativo pelo teste de Dunett). NDI = índice de divisão nuclear ($[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$), M1-M4 são número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos e N o número total de células analisadas.

TABELA 7: Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, Porcentagem (%) de células binucleadas e Índice de Divisão Nuclear (NDI) em culturas de células HepG2 tratadas com tratadas com folhas cruas e cozidas de mandioca mansa^a

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos				% Células binucleadas	NDI
	1	2	3	4		
Controle Negativo	763	702	27	8	46,8	1,52
DXR 0,05	634	816	35	15	54,4	1,62
Crua 0,1	788	681	23	8	45,4	1,50
Cozida 0,1	801	670	24	5	44,7	1,49
Crua 0,5	837	637	18	8	42,5	1,46
Cozida 0,5	817	667	12	4	44,5	1,47
Crua 1,0	888	593	15	4	39,5	1,42
Cozida 1,0	792	684	19	5	45,6	1,49
Crua 5,0	870	611	11	8	40,7	1,44
Cozida 5,0	925	560	12	3	37,3	1,40

^a Para cada experimento (n=3) foi analisada 1 lâmina (500 células por lâmina) totalizando 1500 células analisadas. $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo (Comparação entre tratados e controle negativo pelo teste de Dunett). NDI = índice de divisão nuclear ($[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N$), M1-M4 são número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos e N o número total de células analisadas.

TABELA 8: Distribuição de células de acordo com o número de núcleos, porcentagem (%) de células binucleadas e Índice de divisão Nuclear (NDI) em culturas de células HepG2 tratadas com tucupi cru e cozido de mandioca brava^a

Tratamentos (µg/mL)	Distribuição de células de acordo com o número de núcleos				% Células binucleadas	NDI
	1	2	3	4		
Controle Negativo	736	719	35	10	47,9	1,55
DXR 0,05	532	925	35	8	61,7	1,67
Crua 0,1	873	599	19	9	39,9	1,44
Cozida 0,1	897	581	19	3	38,7	1,42
Crua 0,5	838	645	11	6	43,0	1,46
Cozida 0,5	876	602	14	8	40,1	1,44
Crua 1,0	886	578	29	7	38,5	1,43
Cozida 1,0	900	582	13	5	38,8	1,42
Crua 5,0	897	577	20	6	38,5	1,42
Cozida 5,0	831	635	20	14	42,3	1,48

^a Para cada experimento (n=3) foi analisada 1 lâmina (500 células por lâmina) totalizando 1500 células analisadas. $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo (Comparação entre tratados e controle negativo pelo teste de Dunett). NDI = índice de divisão nuclear $([M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)] / N)$, M1-M4 são número de células com 1, 2, 3 ou 4 núcleos e N o número total de células analisadas.

A Tabela 9 mostra a distribuição do número de micronúcleos (MNs) encontrados em células HepG2 binucleadas tratadas com folhas de mandioca da variedade brava nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 µg/mL. Os grupos tratados em todas as concentrações testadas, bem como o grupo controle negativo, revelaram uma distribuição do número de MNs entre zero e um, não sendo frequentes as células binucleadas com mais de um MN. Por outro lado, o grupo controle positivo (DXR 0,05 µg/mL) revelou um número de MNs entre um e dois. Esse mesmo grupo mostrou um total de células binucleadas com MN, bem como um total de MNs em células binucleadas superior ao grupo controle negativo, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) (Tabela 9).

Em relação aos grupos tratados, todas as concentrações testadas, cruas e cozidas, apresentaram um número de MNs em células binucleadas maior do que o observado no grupo controle negativo, apesar desses valores não serem estatisticamente significativos ($p > 0,05$). Após o cozimento, as concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ diminuíram o número de MNs em relação às amostras cruas e somente a concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$ demonstrou aumento no número de MNs quando comparado à amostra crua. Porém, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos cru e cozido das amostras na mesma concentração ($p > 0,05$) (Tabela 9).

TABELA 9: Distribuição de MNs em células binucleadas, total de células binucleadas com MN e total de MNs em células binucleadas em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas de mandioca da variedade brava^a

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	Distribuição de MNs em células binucleadas					Total de células binucleadas com MN	Total de MNs em células binucleadas
	0	1	2	3	4		
Controle Negativo	2960	35	5	0	0	40	45
DXR 0,05	2804	150	38	6	2	196**	252**
Crua 0,1	2956	33	10	1	0	44	56
Cozida 0,1	2939	52	6	2	0	60	70
Crua 0,5	2952	39	7	2	0	48	59
Cozida 0,5	2956	40	3	1	1	45	53
Crua 1,0	2951	38	9	2	0	49	62
Cozida 1,0	2949	50	1	0	0	51	52
Crua 5,0	2941	50	7	2	0	59	56
Cozida 5,0	2957	39	4	0	0	43	47

^a Para cada experimento ($n=3$) foi analisada 1 lâmina (1000 células BN por lâmina) totalizando 3000 células BN analisadas por tratamento. $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo (Comparação entre tratados e controle negativo pelo teste de Dunett). 0 = número de células binucleadas com 0 MN; 1 = número de células binucleadas com 1 MN; 2 = número de células binucleadas com 2 MN; 3 = número de células binucleadas com 3 MN; 4 = número de células binucleadas com 4 MN. ** = $p < 0,01$ (comparação feita entre controle positivo DXR e grupo controle negativo pelo teste de Dunett).

A Tabela 10 mostra a distribuição do número de MNs encontrados em células HepG2 binucleadas tratadas com folhas de mandioca da variedade mansa nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Todos os grupos, em todas as concentrações testadas, revelaram uma distribuição do número de MNs entre zero e um, não sendo frequentes as células binucleadas com mais de um MN, somente o grupo controle positivo (DXR 0,05 $\mu\text{g/mL}$) revelou um número de MNs entre um e dois. O grupo DXR também mostrou um total de células binucleadas com MN e um total de MNs em células binucleadas superior ao grupo controle negativo, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,01$) (Tabela 10).

Sobre os valores de MNs em células binucleadas de HepG2 tratadas com a variedade mansa de mandioca, a concentração de 0,5 $\mu\text{g/mL}$ da amostra cozida foi a única que apresentou número de MNs igual ao grupo controle negativo, as demais concentrações, tanto cruas quanto cozidas, revelaram aumento na totalidade de MNs encontrados em células binucleadas. Nenhum valor foi estatisticamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). O cozimento não diminuiu efetivamente o número de MN em células HepG2 e não houve diferença estatisticamente significativa na relação dos grupos cru e cozido das amostras na mesma concentração ($p > 0,05$) (Tabela 10).

TABELA 10: Distribuição de MNs em células binucleadas, total de células binucleadas com MN e total de MNs em células binucleadas em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de folhas de mandioca da variedade mansa^a

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	Distribuição de MNs em células binucleadas					Total de células binucleadas com MN	Total de MNs em células binucleadas
	0	1	2	3	4		
Controle negativo	2960	35	5	0	0	40	45
DXR 0,05	2804	150	38	6	2	196**	252**
Crua 0,1	2957	36	6	1	0	43	51
Cozida 0,1	2954	39	6	0	1	46	55
Crua 0,5	2940	53	6	1	0	60	68
Cozida 0,5	2961	34	4	1	0	39	45
Crua 1,0	2950	44	6	0	0	50	56
Cozida 1,0	2954	38	7	1	0	46	55
Crua 5,0	2955	39	6	0	0	45	51
Cozida 5,0	2953	42	3	2	0	47	54

^a Para cada experimento (n=3) foi analisada 1 lâmina (1000 células BN por lâmina) totalizando 3000 células BN analisadas por tratamento. $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo (Comparação entre tratados e controle negativo pelo teste de Dunett). 0 = número de células binucleadas com 0 MN; 1 = número de células binucleadas com 1 MN; 2 = número de células binucleadas com 2 MN; 3 = número de células binucleadas com 3 MN; 4 = número de células binucleadas com 4 MN. ** = $p < 0,01$ (comparação feita entre controle positivo DXR e grupo controle negativo pelo teste de Dunett).

A Tabela 11 mostra a distribuição do número de MNs encontrados em células HepG2 binucleadas tratadas com tucupi de mandioca da variedade brava nas concentrações 0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Os grupos, em todas as concentrações testadas, revelaram uma distribuição do número de MNs entre zero e um. O grupo DXR mostrou um total de células binucleadas com MN e um total de MNs em células binucleadas superior ao grupo controle negativo, com diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) (Tabela 10).

Em relação às amostras de tucupi, cru e cozido, da variedade brava de mandioca, as concentrações de 5,0 $\mu\text{g/mL}$ de amostra crua e 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$ de

amostras cozidas apresentaram valores menores de MN em células binucleadas em relação ao grupo controle negativo, porém não estatisticamente significativo ($p > 0,05$), o restante das concentrações das amostras, cruas e cozidas, demonstraram um aumento no número de MNs em células binucleadas, porém não estatisticamente significativo em relação ao controle negativo ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de MNs em células binucleadas em três concentrações testadas (0,1; 0,5 e 1,0 $\mu\text{g/mL}$) e aumentou o número de MNs somente na concentração de 5,0 $\mu\text{g/mL}$, porém, comparando mesma concentração dos grupos cru e cozido das amostras, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) (Tabela 11).

TABELA 11: Distribuição de MNs em células binucleadas, total de células binucleadas com MN e total de MNs em células binucleadas em culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações de tucupi de mandioca da variedade brava^a

Tratamentos ($\mu\text{g/mL}$)	Distribuição de MNs em células binucleadas					Total de células binucleadas com MN	Total de MNs em células binucleadas
	0	1	2	3	4		
Controle Negativo	2960	37	2	1	0	40	44
DXR 0,05	2864	111	14	8	3	136*	175*
Cru 0,1	2941	53	5	1	0	59	66
Cozido 0,1	2959	35	4	2	0	41	49
Cru 0,5	2953	44	2	1	0	47	51
Cozido 0,5	2972	23	5	0	0	28	33
Cru 1,0	2959	33	8	0	0	41	49
Cozido 1,0	2965	30	4	1	0	35	41
Cru 5,0	2961	37	1	1	0	39	42
Cozido 5,0	2953	39	5	2	1	47	59

^a Para cada experimento ($n=3$) foi analisada 1 lâmina (1000 células BN por lâmina) totalizando 3000 células BN analisadas por tratamento. $p < 0,05$, considerado estatisticamente significativo (Comparação entre tratados e controle negativo pelo teste de Dunett). 0 = número de células binucleadas com 0 MN; 1 = número de células binucleadas com 1 MN; 2 = número de células binucleadas com 2 MN; 3 = número de células binucleadas com 3 MN; 4 = número de células binucleadas com 4 MN. * = $p < 0,05$ (comparação feita entre controle positivo DXR e grupo controle negativo pelo teste de Dunett).

A Figura 23 mostra a média dos valores obtidos do número de MNs em 1000 células HepG2 binucleadas observadas para os tratamentos com folha de mandioca brava e DXR. Todas as concentrações de mandioca testadas, independente do cozimento, demonstraram um leve aumento no número de MNs em relação ao grupo controle negativo, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de MNs em células binucleadas nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$ e aumentou o número de MNs em células binucleadas na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, porém estatisticamente não significativos ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou número de MNs em células binucleadas superior aos do grupo controle negativo com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) (Figura 23).

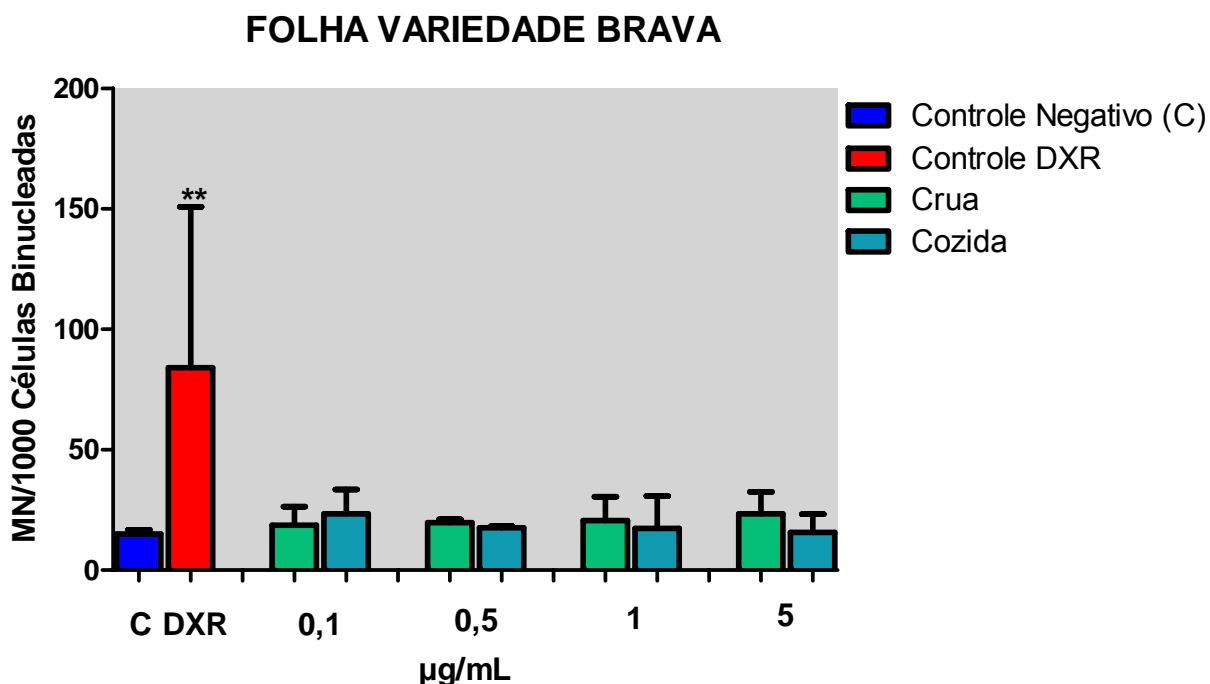


FIGURA 23: Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade brava. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Figura 24 mostra a média dos valores obtidos do número de MNs em 1000 células HepG2 binucleadas observadas para os tratamentos com folha de mandioca mansa e DXR. Para os grupos da mandioca, 0,5 µg/mL da amostra cozida apresentou o mesmo valor de MN em células binucleadas em relação ao grupo controle negativo. As demais concentrações, independente do cozimento, apresentaram valores de MN em células binucleadas um pouco maiores, porém bem próximos ao observado no grupo controle negativo, não havendo diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de MNs em células binucleadas somente nas concentrações de 0,5 e 1,0 µg/mL, mas não estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Comparando mesma concentração, dos grupos cru e cozido, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou número de MNs superior ao grupo controle negativo com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,01$) (Figura 24).

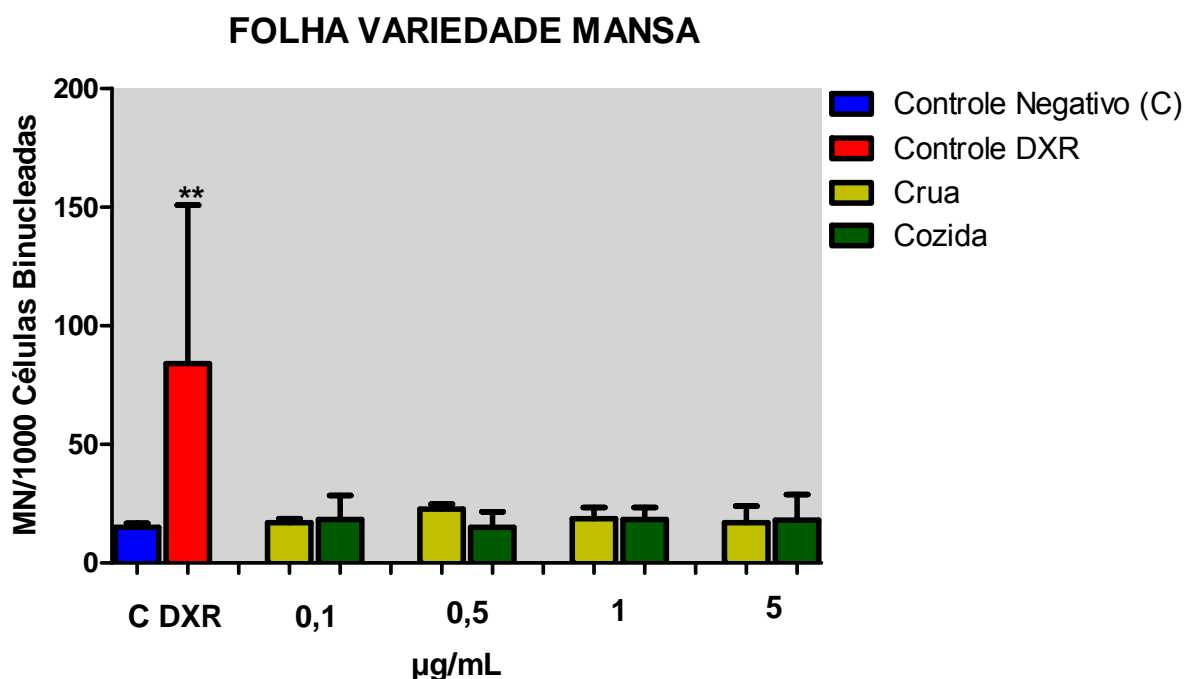


FIGURA 24: Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade mansa. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunnett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Figura 25 mostra a média dos valores obtidos do número de MNs em 1000 células HepG2 binucleadas observadas para os tratamentos com tucupi de mandioca brava e DXR. Para os grupos da mandioca, a concentração de amostra crua 5,0 µg/mL e as concentrações de amostra cozida 0,5 e 1,0 µg/mL apresentaram número de MNs em células binucleadas menor do que o grupo controle negativo, mas não estatisticamente significativo ($p > 0,05$). Após o cozimento, as concentrações 0,1; 0,5 e 1,0 µg/mL diminuíram o número de MNs em células binucleadas em relação à amostra crua, porém com valores estatisticamente não significativos em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Comparando a mesma concentração entre os grupos cru e cozido das amostras de mandioca, não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou número de MNs superior ao grupo controle negativo com diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) (Figura 25).

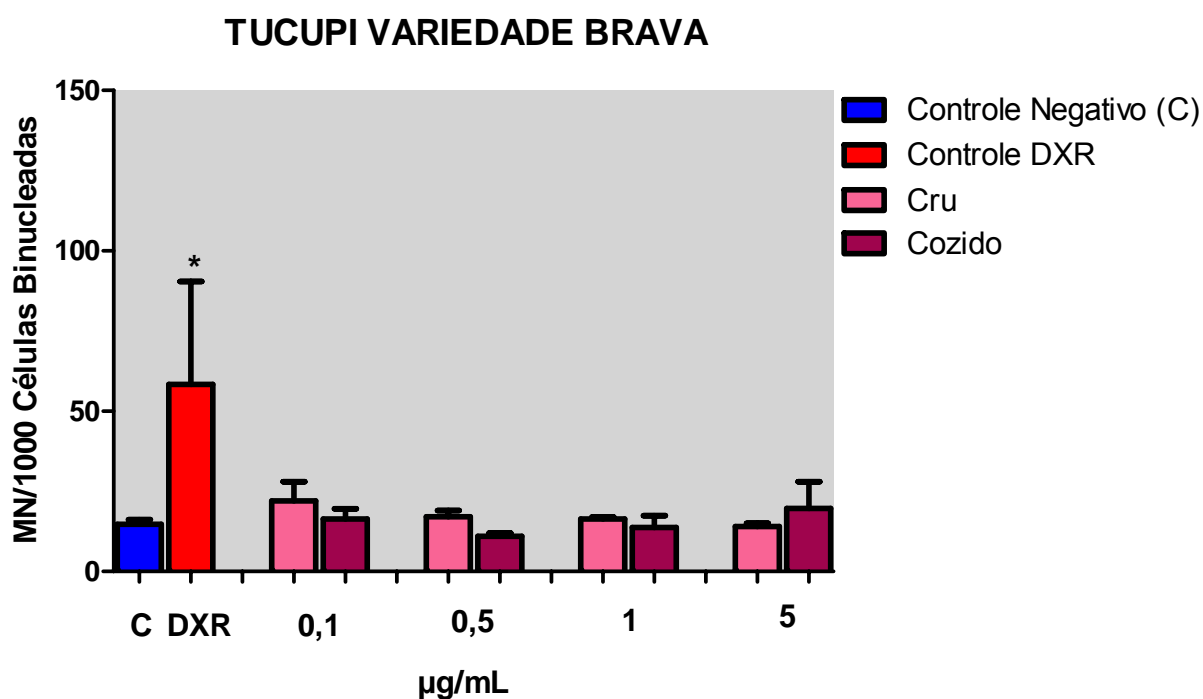


FIGURA 25: Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com tucupi de mandioca variedade brava. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunnett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Figura 26 mostra a média do número de brotos nucleares (NBUDs) em 1000 células binucleadas observadas para os tratamentos com folhas de mandioca brava e DXR. O número de NBUDs encontrado nos tratamentos com a mandioca foi menor, mas próximo ao valor encontrado no grupo controle negativo, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de NBUDs encontrado em células binucleadas, mas não estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Diferenças estatisticamente significativas não foram observadas na comparação dos grupos cru e cozido dessa variedade de mandioca na mesma concentração ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou número de NBUDs superior ao grupo controle negativo, porém estatisticamente não significativo ($p > 0,05$) (Figura 26).

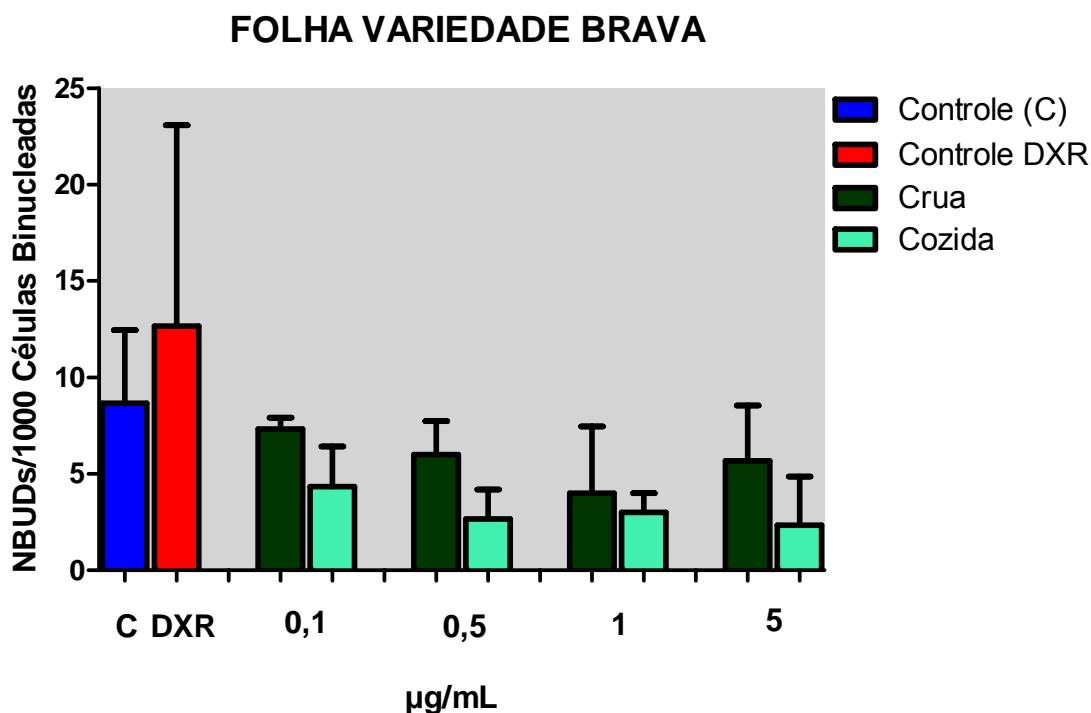


FIGURA 26: Média de Brotos nucleares (NBUDs) em células 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade brava. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Figura 27 mostra a média do número de brotos nucleares (NBUDs) em 1000 células binucleadas observadas para os tratamentos com folhas de mandioca mansa e DXR. O número de NBUDs encontrado nos tratamentos com a mandioca foi menor do que o valor encontrado no grupo controle negativo, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de NBUDs encontrado em células binucleadas somente nas concentrações de 0,5 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$, mas não estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na comparação dos grupos cru e cozido dessa variedade de mandioca na mesma concentração ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou número de NBUDs superior ao grupo controle negativo, porém estatisticamente não significativo ($p > 0,05$) (Figura 27).

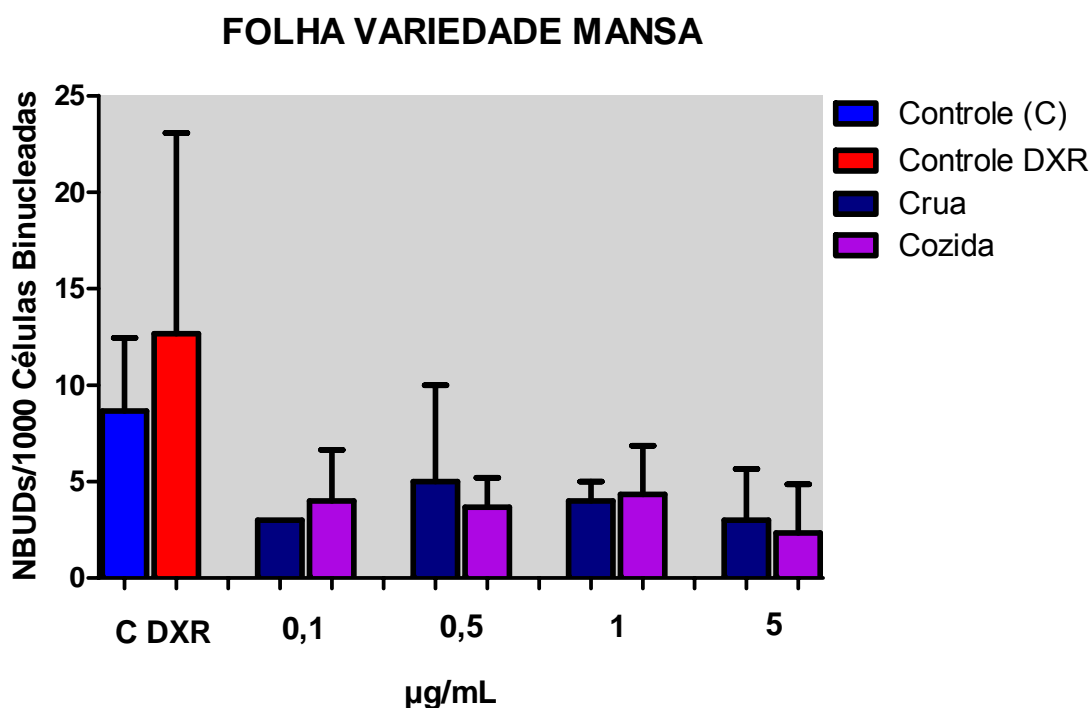


FIGURA 27: Média de Brotos nucleares (NBUDs) em células 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade mansa. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Figura 28 mostra a média do número de brotos nucleares (NBUDs) em 1000 células binucleadas observadas para os tratamentos com tucupi de mandioca brava e DXR. O número de NBUDs encontrado nos tratamentos com a mandioca foi menor do que o valor encontrado no grupo controle negativo, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de NBUDs encontrado em células binucleadas nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$, mas não estatisticamente diferente em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Comparando os grupos cru e cozido dessa variedade de mandioca na mesma concentração, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou número de NBUDs superior ao grupo controle negativo, porém estatisticamente não significativo ($p > 0,05$) (Figura 28).

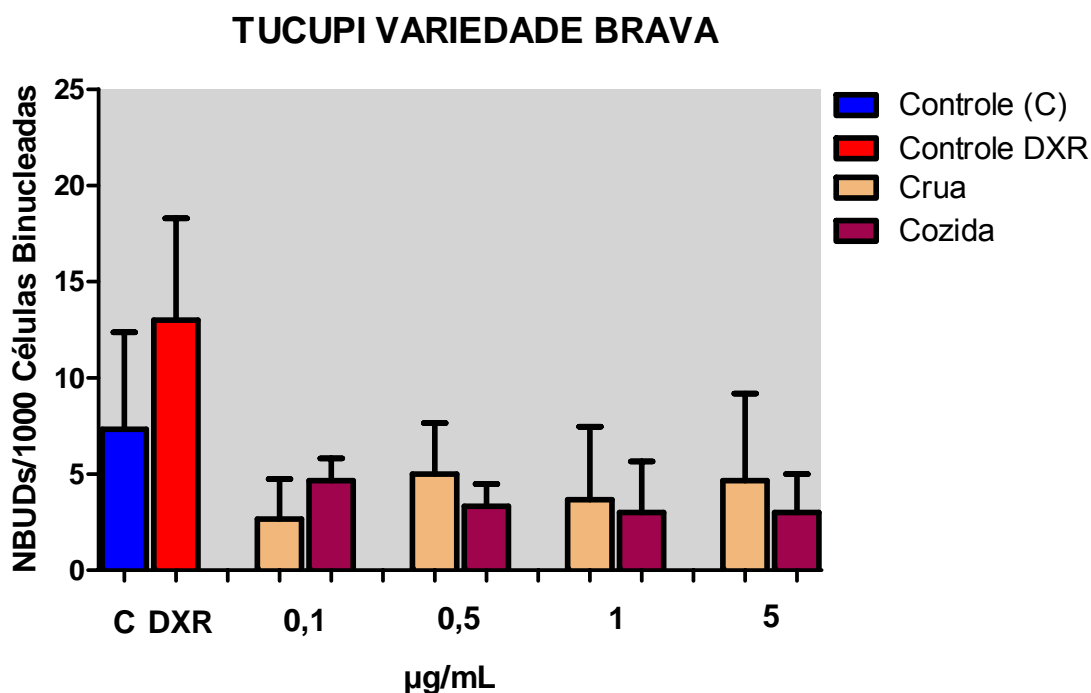


FIGURA 28: Média de Brotos nucleares (NBUDs) em células 1000 células HepG2 tratadas com tucupi de mandioca variedade brava. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Figura 29 mostra a média do número de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 binucleadas observadas para os tratamentos com folhas de mandioca brava. Os valores de NPBs encontrados nos tratamentos com a mandioca foram próximos ao valor encontrado no grupo controle, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de NPBs em células binucleadas nas concentrações de 0,1 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$. Comparando os grupos cru e cozido dessa variedade de mandioca na mesma concentração, diferenças estatísticas significativas não foram observadas ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou valor de NPBs superior ao grupo controle negativo, porém não estatisticamente significativo ($p > 0,05$) (Figura 29).

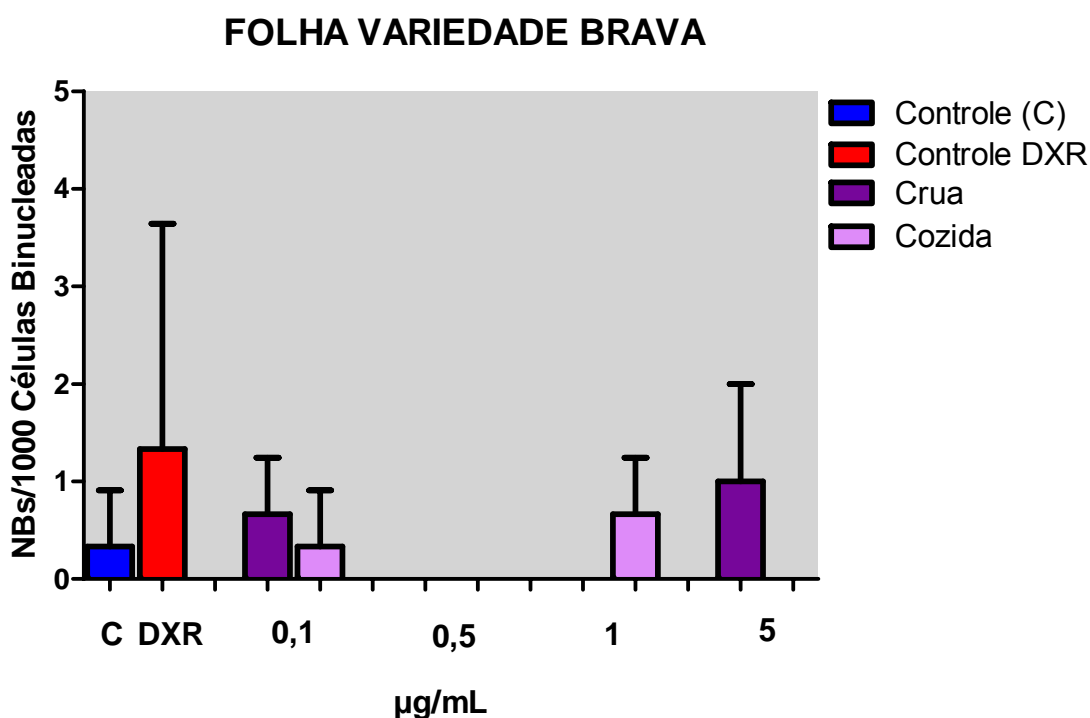


FIGURA 29: Média de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade brava. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

A Figura 30 mostra a média do número de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 binucleadas observadas para os tratamentos com folhas de mandioca mansa. Os valores de NPBs encontrados nos tratamentos com a mandioca foram próximos ao valor encontrado no grupo controle, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de NPBs em células binucleadas nas concentrações de 0,5; 1,0 e 5,0 $\mu\text{g/mL}$, mas não estatisticamente significativo em relação ao grupo controle negativo ($p > 0,05$). Quando são comparados os grupos cru e cozido na mesma concentração dessa variedade de mandioca, não foram observadas diferenças estatísticas significativas ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou valor de NPBs superior ao grupo controle negativo, porém não estatisticamente significativo ($p > 0,05$) (Figura 30).

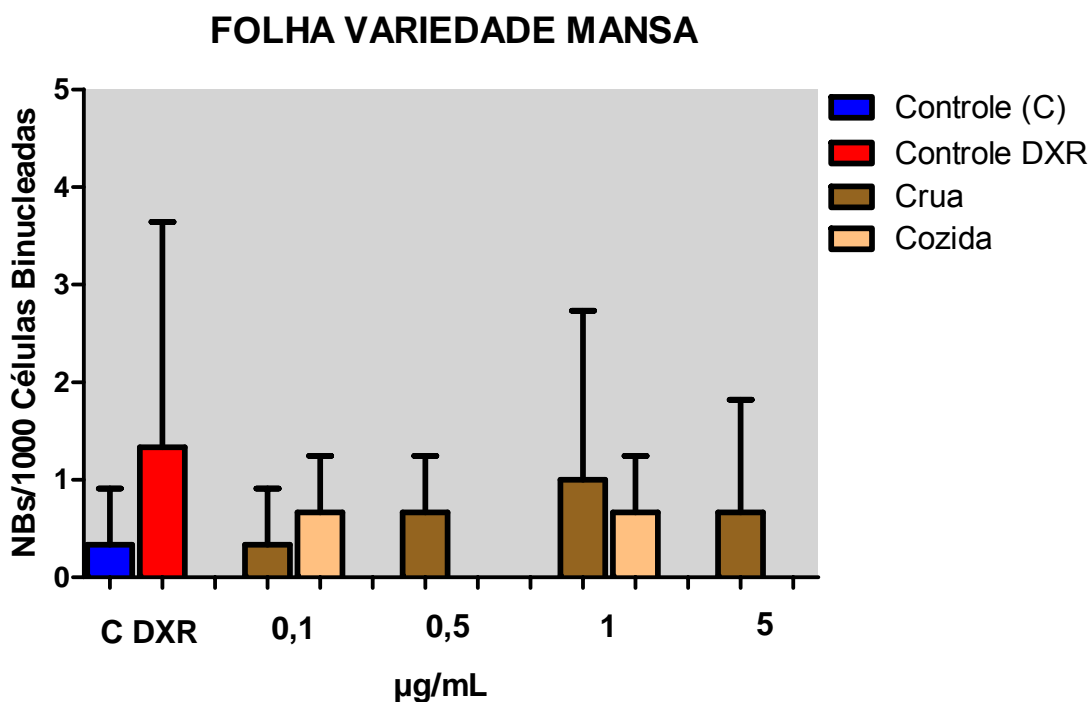


FIGURA 30: Média de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade mansa. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ considerado estatisticamente significativo.

A Figura 31 mostra a média do número de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 binucleadas observadas para os tratamentos com tucupi de mandioca brava. Os valores de NPBs encontrados nos tratamentos com a mandioca foram próximos ao valor encontrado no grupo controle negativo, não apresentando diferença estatística significativa ($p > 0,05$). O cozimento diminuiu o número de NPBs em células binucleadas na concentração de 0,1 $\mu\text{g/mL}$, porém estatisticamente não significativo em relação o grupo controle negativo ($p > 0,05$). Não foram observadas, para a mesma concentração utilizada, diferenças estatísticas significativas entre os grupos cru e cozido dessa variedade de mandioca ($p > 0,05$). O grupo DXR apresentou valor de NPBs inferior ao grupo controle negativo, porém não estatisticamente significativo ($p > 0,05$) (Figura 31).

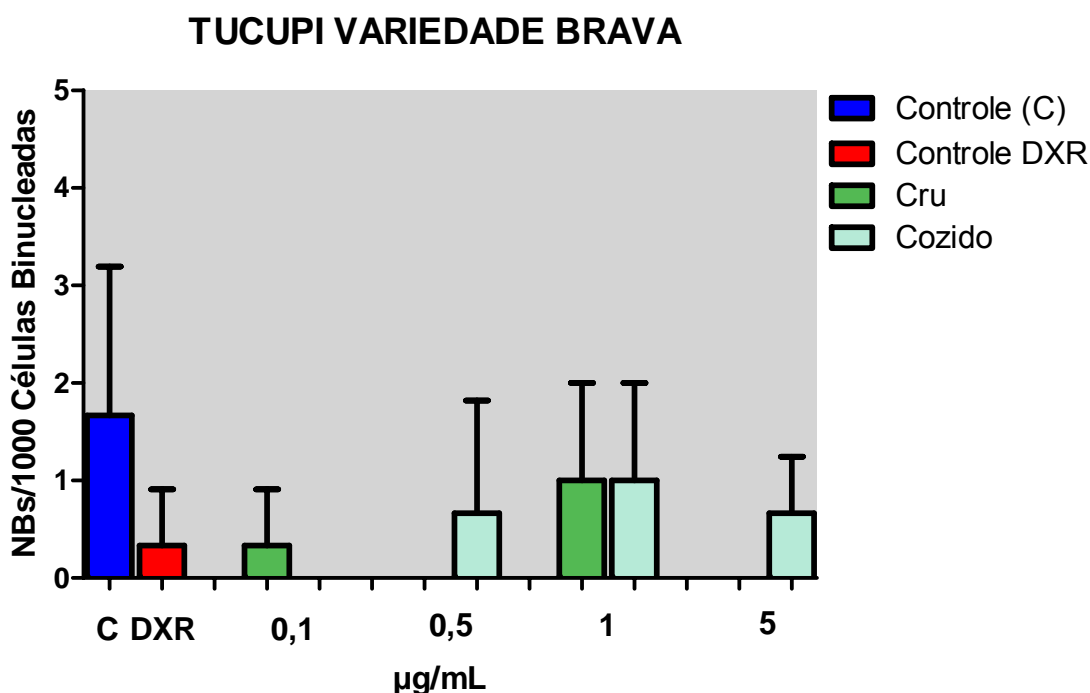


FIGURA 31: Média de pontes nucleoplasmáticas (NPBs) em 1000 células HepG2 tratadas com tucupi de mandioca variedade brava. Foram realizados três ensaios independentes, sendo analisadas 3000 células HepG2 binucleadas por tratamento com análise ANOVA pelos métodos de Dunett, comparação entre cada concentração utilizada e o grupo controle negativo (C) e Tukey, comparação entre os grupos cru e cozido na mesma concentração, onde $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

5.1 Avaliação dos Compostos Cianogênicos das Amostras de Mandioca Após Cozimento

A ação mecânica, química ou qualquer processo sofrido pela mandioca que rompa a integridade das células trará as enzimas para o contato com os glicosídeos da planta (PADMAJA, 1995). O glicosídeo cianogênico linamarina, uma vez quebrado, por meio da ação da enzima β -glicosidase (linamarase) produz acetocianonidrina, esse último composto sofre ação de outra enzima α -hidroxinitriloliase, liberando o cianeto que fica livre e solúvel na planta (Figura 1) (FORSLUND et al., 2004).

Assim, cianeto livre é definido como a forma de cianeto molecular ou iônica liberada em solução aquosa pela diluição ou dissociação de compostos ou complexos de cianeto. O termo cianeto livre compreende duas espécies: a iônica (CN^-) e a molecular (HCN), também chamada de cianeto de hidrogênio ou ácido hidrocianídrico (HCN), que é um ácido fraco e incolor (LEMOS, 2008; VETTER, 2000). Desta forma, a toxicidade da mandioca depende da quantidade de íon CN^- livre presente, que quando na forma iônica e em solução aquosa, pode unir-se a vários compostos como Na, Ca, Hg, Cu, Zn, Ni, Ag ou se ligar mais facilmente com prótons H^+ formando o ácido cianídrico altamente tóxico ($\text{CN}^- + \text{H}^+ \rightarrow \text{HCN}$).

Nas folhas, a alta atividade da linamarase e α -hidroxinitriloliase, espontânea em pH a partir de 5,5 e estimulada por ação mecânica ou química, permite a rápida conversão de linamarina em cianeto livre, o qual pode ser eliminado facilmente por ser volátil. Já nas raízes, os baixos níveis da enzima linamarase somado a atividade negligenciável da enzima α -hidroxinitriloliase resulta em baixa eliminação de linamarina e acúmulo de acetocianonitrina (NAMBISAN, 2011). O limite de 50 mg a 100 mg/kg do ácido cianídrico (HCN) quando consumido produz extrema toxicidade (LOPES, 2001; HELBIG, 2008). Assim, o cozimento adequado é extremamente importante para a liberação de CN^- livre das amostras.

Compostos cianogênicos são capazes de agir celularmente, provocando formação de radicais livres, estes, por sua vez, podem oxidar biomoléculas

resultando em substratos como aldeídos, cetonas e hidroperóxidos, os quais podem interagir com o DNA e promover dano (HARANGI et al., 2002; LI et al., 2010). Grande liberação de compostos cianogênicos é feita a partir de intenso aquecimento (LEMOS, 2008; NAMBISAN, 2011).

O cozimento, a 90°C, de 24 horas e 1 hora foi estabelecido para que uma grande parte do CN⁻ livre pudesse ser extraída das folhas e tucupi, respectivamente. Por outro lado, vale ressaltar que as enzimas que degradam glicosídeos cianogênicos agem em pH em torno de 5,5 e temperaturas de 40 a 45°C. Redução significativa na atividade das enzimas é observada em pH abaixo de 4,0 e temperaturas superiores a 50°C e total inatividade enzimática em temperaturas superiores a 70°C (ARIAS et al., 2001, NAMBISAN, 2011). Desta forma, o aquecimento favoreceu a retirada de CN⁻ livre que é volátil, mas não de CN⁻ ligado a carboidratos ou a outros compostos cianogênicos (acetocianonidrina) que podem não ter sido biodegradados, uma vez que as enzimas foram inativadas no processo de cozimento das amostras.

O CN⁻ está presente em todas as partes da planta, mas principalmente nas folhas (200 – 1.300 mg/ Kg de peso seco) e, em menor proporção, nas raízes (10 – 500 mg/kg de peso seco) (NGUDI; KUO; LAMBEIN, 2003; SIRITUNGA; SAYRE, 2004). Contudo, os valores de CN⁻ total encontrados nesse trabalho foram bem maiores no tucupi proveniente das raízes de mandioca brava cruas (1.789,10 mg/kg) (Figura 6) do que nas folhas da mesma mandioca também cruas (221,08 mg/kg) (Figura 4). Este dado pode estar relacionado ao fato de que raízes de mandioca possuem atividade da enzima linamarase muito menor do que nas folhas e nenhuma atividade da enzima α -hidroxinitriloliase, desta forma, após a trituração, as raízes da mandioca brava presumivelmente acumularam níveis potencialmente tóxicos de linamarina e acetocianonidrina (SANT'ANA; DOMENE, 2008; SIRITUNGA; SAYRE 2004).

A partir da leitura dos valores, referentes às folhas de mandioca, representados no gráfico da figura 4, podemos observar que houve aumento na concentração de CN⁻ total após cozimento de 24 horas, tanto na variedade brava quanto mansa, o que pode estar associado a um aumento de compostos cianogênicos produzidos durante o aquecimento das amostras e prévia

desnaturação enzimática. Todavia, observando o gráfico da figura 5, houve redução significativa de CN⁻ livre após o cozimento dessas folhas, uma vez que o CN⁻ livre é de fácil remoção pelo aquecimento. Esses achados podem estar relacionados ao fato de que altas temperaturas ao mesmo tempo em que liberam CN⁻ livre também inativam as enzimas responsáveis pela detoxificação de glicosídeos cianogênicos nas folhas (ARIAS et al., 2001).

Esses resultados estão de acordo com os de Maduagwu e Umoh (1982) que observaram redução muito maior na quantidade de CN⁻ livre do que CN⁻ ligado após aquecimento de 20, 40, 60 e 80 minutos de folhas de mandioca. Ainda, Carlsson e colaboradores (1999) estudando os efeitos da linamarina em preparações dietéticas, a partir do cozimento da mandioca, observaram que cianonidrina resiste ao cozimento em pequeno intervalo de tempo e linamarina é estável a altas temperaturas. Desta forma, esses glicosídeos não degradados tornam o vegetal potencialmente tóxico não limitando sua atividade biológica.

Ainda na análise das folhas de mandioca, foi observado que, quando cruas, a variedade mansa apresentou quantidades superiores de CN⁻ total (270,90 mg/kg de folha) (Figura 4) e livre (130,30 mg/kg de folha) (Figura 5) em relação a variedade brava, 221,08 mg/kg de folha (CN⁻ total) e 56,64 mg/kg de folha (CN⁻ livre). Esse dado sugere deficiência na separação dos cultivares durante o plantio, uma vez que a base do BAG da EMBRAPA é composta por materiais coletados em propriedades de agricultores familiares de várias regiões do estado (GIRENA et al., 2010). É válido ressaltar que populações ribeirinhas utilizam ambas as variedades de mandioca sem tomarem o devido cuidado com a segurança alimentar durante o plantio, demonstrando fragilidade na produção agrícola doméstica no que se refere ao cultivo da mandioca (ADAMS; MURRIETA; SANCHES, 2005; MURRIETA et al., 2008).

Observando os resultados das amostras de tucupi, tanto a variedade brava quanto a variedade mansa, apresentaram redução significativa de CN⁻ total e livre após cozimento de 24 horas (Figuras 6 e 7, respectivamente). A redução significativa da quantidade de CN⁻ nessas amostras indica a importância do processamento térmico da mandioca, porém grande quantidade de CN⁻ total (em

torno de 34%) ainda é observada após esse cozimento na variedade brava (587,12 mg/kg de tucupi) (Figuras 6).

Os valores encontrados nesse trabalho extrapolam os índices de toxicidade preconizados pelo *Codex Alimentarius Commission* da FAO/WHO (1988) de 10 mg HCN/Kg de matéria fresca (AGOSTINI, 2006; HELBIG et al., 2008; LOPES, 2001; SANT'ANA; DOMENE, 2008). Sabendo que a quantidade de tucupi existente em uma cuia de tacacá, preparação culinária com goma de tapioca, tucupi, camarão e jambú, servida quente, está em torno de 250 mL, o paraense estará introduzindo em seu organismo aproximadamente 146,78 mg de HCN dessa variedade de mandioca. Desta forma, o aquecimento desse tucupi em torno de 1 hora seria insuficiente para garantir seu consumo de forma segura, uma vez que pode ter ocorrido um aumento nos níveis potencialmente tóxicos de linamarina, que se torna estável em altas temperaturas, e acetocianonidrina, após a trituração das raízes para retirada do tucupi, associada à baixa atividade da enzima linamarase, nenhuma atividade da enzima hidroxinitriloliazase nas raízes e processamento térmico inadequado (NAMBISAN, 2011; SANT'ANA; DOMENE, 2008; SIRITUNGA; SAYRE, 2004).

Por outro lado, concentração de CN⁻ total no tucupi da variedade mansa reduziu significativamente após o cozimento, de 250,22 mg/kg para 25,72 mg/kg de tucupi (Figura 6), fazendo dessa variedade uma possível opção de escolha para o consumo, uma vez que em 250 mL de tucupi conteriam aproximadamente 6,43 mg de HCN, abaixo do limite de toxicidade (10 mg de HCN/Kg de matéria fresca). O processamento térmico foi importante para liberação de CN⁻ livre das amostras de mandioca brava e mansa, porém insuficiente para garantir a extração da quantidade de CN⁻ total presente nas amostras de tucupi da variedade brava.

Os efeitos tóxicos da mandioca dependem da dose e duração da exposição. Valores de CN⁻ liberado a partir da manipulação da mandioca variam entre populações dependendo do cultivar e método de processo (OZOLUA, et al., 2007). O melhor método de processamento para o consumo de mandioca como alimento humano é a moagem das folhas e a retirada da película de revestimento da raiz e longo processo de cozimento em água, tanto das raízes quanto das folhas, porém esse processo não permite a total eliminação dos compostos cianogênicos da amostra quando mal realizado (CEREDA; MATTOS, 1996; PADJAMA, 1995).

5.2 Avaliação dos Ensaio de Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

Citotoxicidade pode ser definida como a capacidade de um composto químico induzir morte celular. Genotoxicidade é a capacidade que algumas substâncias têm de induzir alterações no material genético de organismos a elas exposto. Mutagenicidade diz respeito à indução de alterações (mutações) permanentes e transmissíveis na quantidade ou na estrutura do material genético (GUILLOUSO, 1998). Compostos químicos podem ser mutagênicos ao organismo a medida que afetam a estrutura espacial da molécula do DNA, mudando a identidade química de seus componentes. Mutações no DNA podem ter consequências importantes sobre o funcionamento das células, diminuindo a capacidade das mesmas em produzir enzimas necessárias para seu funcionamento ou aumentando a capacidade celular em sintetizar enzimas, que prejudicam o próprio metabolismo celular (CASALEGNO; BENFENATI; SELLO, 2011).

Para determinar a citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de compostos químicos podem ser utilizados tanto ensaios *in vivo* quanto ensaios *in vitro*. Ensaios *in vivo* apresentam algumas desvantagens quanto ao estudo dos efeitos tóxicos de um determinado agente químico, pois estão condicionados a todos os parâmetros cinéticos do organismo onde a agressão foi induzida. Além disso, estudos *in vivo* requerem aprovação pelos comitês de ética na pesquisa com animais e são mais dispendiosos. Por outro lado, estudos *in vitro* vêm se intensificando e ganhando melhor abordagem na investigação de mecanismos pelos quais agentes químicos induzem lesões celulares. A correlação entre a toxicidade *in vitro* e toxicidade sistêmica aguda tem sido largamente realizada e vários modelos *in vitro* são utilizados para prever a toxicidade sistêmica basal ou toxicidade em órgãos específicos (HARIHARAKRISHNAN et al., 2009).

Dentre os sistemas celulares *in vitro* empregados em ensaios de citotoxicidade, o isolamento de hepatócitos ganha destaque. Esse sistema possui a capacidade de fornecer informações sobre como os compostos químicos podem ser metabolizados e como a célula pode ser afetada por um determinado composto químico. Preparações *in vitro* a partir do fígado são metabolicamente competentes e capazes de produzir compostos similarmente ao sistema *in vivo* (GUILLOUSO, 1998; RAO; SCREEDEVI; RAO, 2009).

A linhagem particular de células hepáticas que vem se destacando em estudos de toxicidade de xenobióticos é a derivada de hepatoblastoma humano, HepG2. São células mais uniformes, pequenas, as quais mantêm várias características metabólicas hepato-específicas em resposta aos diferentes tipos de agentes, enzimas de Fase I e Fase II, um bom funcionamento do sistema citocromo P450, glutatona e sulfotransferase que são cruciais para a ativação e/ou desintoxicação de genotóxicos pró-cancerígenos e por ser uma linhagem diferenciada, permite a investigação do efeito tumoral diante da agressão produzida por determinado agente químico (JAVITT, 1990; MAIER et al., 2010; SEVERIN et al., 2010; VALENTIN-SEVERIN et al., 2003).

Uma vasta gama de marcadores das características morfológicas e bioquímicas pode ser utilizada para a obtenção de informações a nível celular e molecular a fim de detectar e medir perturbações químicas induzidas. Vários parâmetros de análise podem ser propostos, os quais podem estimar a integridade da membrana plasmática ou efeitos subcelulares, avaliar a citotoxicidade irreversível (morte celular) ou refletir alterações reversíveis e/ou inespecíficas (GUILLOUSO, 1998). Entre os ensaios de curto prazo para avaliação em células HepG2 da genotoxicidade e mutagenicidade de compostos, os ensaios do cometa e micronúcleo são os mais promissores devido a sensibilidade e fácil execução.

Como controle positivo para os ensaios de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade das amostras de mandioca foi escolhido o fármaco DXR, o qual vem sendo amplamente usado no tratamento de carcinoma hepatocelular (LEE; LAU; NG, 2002; RANG et al., 2008). A DXR é fármaco citotóxico da classe das antraciclinas, isolado a partir da cultura de *Streptomyces peucetis*, se intercala no DNA estabilizando o complexo DNA-topoisomerase II, interrompendo a forquilha de replicação (RANG et al., 2008).

Testes de viabilidade celular são extremamente importantes para determinar se 50% de células tratadas com algum agente permanece viável, o que denominamos de IC₅₀. A fim de selecionar concentrações adequadas, evitando falsos negativos ou positivos, foram realizados ensaios prévios de citotoxicidade a partir do teste com MTT. Neste estudo, o ensaio do MTT foi utilizado para determinar

a citotoxicidade geral do cianeto de potássio e de mandioca (folhas e tucupi) em cultura de células HepG2.

O cianeto de potássio ou cianureto de potássio é um composto químico altamente tóxico, pois contém o íon CN^- que causa intoxicação, reagindo com a hemoglobina e impedindo o transporte de oxigênio aos tecidos, acarretando morte rápida. Ao entrar em contato com qualquer composto doador de prótons H^+ , o KCN pode ser convertido em HCN, potencialmente hematotóxico (LOPES, 2001). Alguns estudos têm demonstrado que KCN forma um complexo com o íon férrico (Fe^{+3}), da enzima mitocondrial citocromo oxidase, impedindo sua redução para íon ferroso (Fe^{+2}) (GÓRNIK, 2010; OZOLUA et al., 2007; SHANG et al., 2008; SOTO-BLANCO; ZHU et al., 2007). O KCN pode interromper a respiração aeróbica por impedimento da transferência de elétrons na cadeia respiratória, forçando as células a desempenharem o metabolismo anaeróbio (LESTARI et al., 2005).

Há evidências mostrando que MTT é um bom marcador para os efeitos citotóxicos de substâncias desconhecidas (SHANG et al., 2008), pois, mitocôndrias ativas de células vivas podem decompor o sal de MTT para produzir formazan, cujo montante reflete diretamente o número de células viáveis bioquimicamente. No presente estudo, os resultados obtidos no ensaio do MTT revelaram que em algumas amostras cruas o aumento na concentração dos compostos testados produz uma diminuição na porcentagem de células vivas e quando essas amostras são submetidas ao cozimento, apesar dos valores não serem estatisticamente significativos, ocorre um aumento na proporção de células viáveis por esse ensaio.

Segundo Henderson e colaboradores (1998), a genotoxicidade de compostos de risco desconhecido somente pode ser avaliada quando a viabilidade celular obtiver valores acima de 70% podendo estar relacionada a dose. Zhu e colaboradores (2007) testaram KCN nas concentrações que variaram de 0,01 a 0,1mM em células neuronais e observaram que altas concentrações produziram citotoxicidade acentuada e baixa viabilidade celular, somente 0,05 mM apresentaram 70,93% de viabilidade, sendo escolhida para os demais ensaios de dano celular.

Vock e colaboradores (1998) estudaram a indução, pelo KCN, de quebras de fita dupla de DNA, utilizando concentrações previamente determinadas, em ensaios

de citotoxicidade e observaram que os danos produzidos no DNA foram vistos apenas após a redução da viabilidade celular para menos de 60%. Esses mesmos pesquisadores observaram que rupturas de filamentos duplos de DNA foram consequência de danos extragenômicos, sendo um efeito secundário dependente da alta citotoxicidade em combinação com a letalidade celular e que podem ter sido resultado ou da liberação de endonucleases, como consequência do dano à membrana, ou por espécies reativas do oxigênio geradas a partir da ativação de NADPH citocromo P450 redutase devido as altas concentrações de KCN testadas. Desta forma, altas concentrações de KCN ocasionam morte celular e baixas concentrações podem ou não induzir genotoxicidade. Neste estudo, concentrações maiores que 60,0 µg/mL de KCN obtiveram redução significativa na viabilidade celular (Figura 9) e se mostram inviáveis nos ensaios de genotoxicidade.

Em vários ensaios de citotoxicidade e genotoxicidade *in vitro* o KCN tem se mostrado não mutagênico, porém citotóxico e genotóxico dependente da concentração (ECETOC, 2007; HARIHARAKRISHNAN et al., 2009; NTP, 1993; WHO, 2004). Em estudos produzidos por Bhattacharya e colaboradores (2002), 5mM de KCN produziu citotoxicidade e fragmentação do DNA em timócitos de ratos *in vitro*. Em células renais de bebê hamster (BHK-21), KCN também foi citotóxico e induziu danos ao DNA, mas este último, foi menos significativo quando comparado aos danos produzidos em timócitos de ratos (BHATTACHARYA; RAO, 1997, 1999). Ensaio de mutagenicidade com *Drosophila* indicaram que a falha metabólica, observada em concentrações altamente citotóxicas, também pode ter afetado replicação do DNA e separação de cromátides. Porém, este foi considerado um efeito secundário de toxicidade pois não foi observado quando se utilizou concentrações de cianeto que não inibiram o metabolismo dependente de oxigênio (ECETOC, 2007).

Neste estudo, tanto pela análise visual (frequência de dano) (Tabela 1) quanto pela análise a partir do software (porcentagem de DNA na cauda)(Tabela 5), as três concentrações de KCN utilizadas (5,0; 15 e 25,0 µg/mL) induziram significativamente danos ao DNA quando comparadas ao grupo controle negativo ($p < 0,001$). Por outro lado, quando observamos os dados do *tail moment*, que reflete o tamanho da cauda x intensidade da cauda, e *olive moment*, que representa o tamanho da cauda x fração de DNA na cauda, nenhuma das concentrações de KCN testadas

apresentou resultados significativos quando comparados ao grupo controle negativo (Tabela 5). Esses resultados sugerem que a formação de cometas reflete danos indiretos ao DNA como consequência secundária dos danos bioquímicos às membranas celulares, o que é revelado pela frequência de dano e porcentagem de DNA na cauda observados.

Quando se utilizou amostras de mandioca, tanto cruas quanto cozidas, os resultados citotóxicos revelaram que o aumento da concentração produziu a diminuição na viabilidade celular e que, quando as amostras são submetidas ao cozimento, essa viabilidade permanece inversamente proporcional a concentração utilizada, porém os valores observados para viabilidade celular de amostras submetidas ao aquecimento ficam mais próximos dos valores do grupo controle negativo.

Quando se avalia a frequência de dano produzida pelas amostras de folhas e tucupi de mandioca em diferentes concentrações (Tabelas 2, 3 e 4), percebe-se que o cozimento não reduziu o dano ao DNA de células HepG2 e que, em alguns casos os valores de frequência de dano estavam maiores do que os observados no tratamento das células pelas amostras cruas. Esse resultado está de acordo com os valores maiores de CN^- total encontrados nas amostras das folhas de mandioca, tanto brava quanto mansa, mesmo depois de cozidas (Figura 4). Os valores maiores na porcentagem de DNA na cauda (Figuras 14, 15 e 16), *Tail moment* (Figuras 17, 18 e 19) e *Olive moment* (Figuras 20, 21 e 22) em relação ao grupo controle negativo, não foram significativos, de maneira geral, e não podem confirmar o dano ao DNA de células HepG2 produzido pelas amostras de mandioca, mesmo depois de cozidas. Desta forma, o cozimento não representou um método de importância na detoxificação de compostos potencialmente tóxicos, mas não exclui a possibilidade de citotoxicidade e genotoxicidade produzida pelos mesmos. Estudos conduzidos por Maduagwu e Umoh (1982) mostraram que folhas de mandioca cozidas a altas temperaturas permitem a perda de 57% dos glicosídeos cianogênicos presentes nas amostras, como resultado da degradação desses compostos e produção de CN^- livre que volatiliza facilmente. Por outro lado, eles também observaram a formação de subprodutos cianogênicos, os quais ficaram retidos nas amostras.

A frequência de dano ao DNA de células HepG2 produzida pelas folhas mandioca brava e mansa pode estar relacionada ao fato de que o cozimento de 24 horas pouco alterou a concentração de CN^- total nessas variedades de mandioca, ratificando a alta frequência de dano observada e o número de nucleóides vistos pertencentes a classe 4 (Tabela 3). Ainda, as amostras não possuem somente CN^- livre em sua composição, mas são ricas em outros compostos previamente existentes ou subprodutos produzidos a partir de reações formadas pelo aquecimento (AMORIM; MEDEIROS; RIET-CORREA, 2006), os quais também podem provocar dano ao DNA. Assim, o cozimento de 24 horas foi insuficiente para extrair todo o cianeto da amostra, porém suficiente para estimular a produção de compostos cianogênicos, os quais podem estar envolvidos na geração de danos ao DNA em células HepG2 aqui testadas.

A frequência de dano ao DNA de células HepG2 produzida pelo tucupi pode estar ligado ao fato de que, apesar da redução na concentração de CN^- total dessa amostra de tucupi pelo cozimento, quantidades relevantes de acetocianonidrina e linamarina não degradada, além de outros compostos presentes na amostra foram capazes de induzir dano ao DNA de células HepG2 nas concentrações testadas, indicando que o cozimento de 1 hora foi insuficiente na detoxificação de todos os compostos cianogênicos no tucupi da variedade brava de mandioca.

Por meio de uma série de estudos bioquímicos, morfológicos e fisiológicos, o cianeto tem demonstrado sua potência como agente tóxico (MILLS et al., 1996). Exposição ao cianeto leva a inúmeras condições bioquímicas, incluindo inibição da atividade de muitas enzimas, como succinato desidrogenase e enzimas antioxidantes (glutathione peroxidase, glutathione reductase, superóxido desmutase e catalase), além da citocromo oxidase, gerando também aumento de espécies reativas do oxigênio (JONES et al., 2000; SHANG et al., 2008). Baixas concentrações de cianeto em culturas primárias de neurônios corticais induziram extensa morte celular por apoptose (SHOU et al., 2000). Exposição de célula de feocromocitoma de ratos (PC12) a KCN iniciou um processo de autodestruição devido a liberação de espécies reativas de oxigênio e seus intermediários que desempenham um papel importante na ativação da apoptose (MILLS et al., 1996). Shang e colaboradores (2008), também trabalhando com essa linhagem diferenciada em células pré-neuronais, perceberam que a sobrevivência dessas células foi marcadamente

diminuída após a exposição a 200 μmol de KCN por 30 minutos e que sua citotoxicidade foi acompanhada pela alteração nos radicais livres e atividade $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$. Shou e colaboradores (2000) demonstraram que, em célula granular cerebelar *in vitro*, espécies reativas de oxigênio são geradas após o tratamento com cianeto e que um bloqueio na síntese dessas espécies atenua a morte celular induzida por esse agente. Estudos conduzidos por Li e colaboradores (2002) demonstraram indução de morte celular a partir da geração de mediadores inflamatórios pela atuação da enzima ciclooxigenase tipo 2 (COX-2) tempo-dependente e radicais livres em células neuronais tratadas com 300 μM de KCN.

Segundo esses autores, o mecanismo básico que leva a destruição de células nervosas pelo cianeto seria, a ativação de receptores NMDA (N-metil-d-aspartato) e com isso mobilização e acúmulo de cálcio intracelular, o qual mediará uma série de eventos bioquímicos que, a partir da inibição do sistema enzimático produtor de ATP e sistema antioxidante levaria a depleção rápida dos níveis de ATP, produção intensa de radicais livres e óxido nítrico, permitindo extensa peroxidação lipídica de células de membrana, proteínas e DNA, promovendo perda da homeostase iônica, excitotoxicidade, anóxia e morte neuronal por apoptose (HARIHARAKRISHNAN et al., 2009; SHANG et al., 2008; ZHU et al., 2007).

O mecanismo de destruição pelo cianeto comprometendo o sistema antioxidante parece também estar presente em outras células do organismo além dos neurônios. Em células de rim de macaco (LLC-MK2), concentrações de 2,5 mM de KCN causaram citotoxicidade e 0,31 mM de KCN levaram a diminuição dos níveis de ATP, evidente em poucos minutos após a exposição. Já 1,25 mM KCN elevaram os níveis das espécies reativas de oxigênio e peroxidação lipídica (HARIHARAKRISHNAN et al., 2009). Citotoxicidade e dano ao DNA de células renais foram induzidos por KCN, mediados pela alteração no *status* antioxidante com elevação de radicais livres levando a morte celular por apoptose (HARIHARAKRISHNAN et al., 2009).

Em estudos feitos por Bhattacharya e Rao (1999), os níveis de glutatona são reduzidos e isso leva ao dano no DNA de células BHK-21 na presença de doses menores de KCN, quando comparadas a dose altamente citotóxica. No organismo, a detoxificação do cianeto, mediada pela conversão enzimática da molécula em um

produto não tóxico, tiocianato, é um processo relativamente baixo, pois essa capacidade enzimática de detoxificação está concentrada principalmente no fígado, sendo limitada no espaço extracelular. Ainda, esse processo é influenciado pela concentração de grupos doadores de enxofre, os quais podem ser insuficientes quando se trata de uma dieta pobre em proteínas, limitando, dessa forma, a detoxificação do cianeto diante de uma intoxicação crônica (BASKIN et al., 1999; BHATTACHARYA; RAO; VIJAYARAGHAVAN, 2002).

Consequências do excesso de espécies reativas de oxigênio levariam a danos oxidativos à proteína, lipídios e DNA (SHANG et al., 2008). A produção de energia mitocondrial prejudicada pelo cianeto é acompanhada pela acidose láctica, elevados níveis de cálcio intracelular, diminuição dos níveis de ATP e peroxidação lipídica, o que levaria a ativação de proteases, lipases e xantina oxidase, culminando com a morte celular. Essas possíveis implicações da toxicidade do cianeto em células não neuronais levam a exarcebação da toxicidade, podendo causar extenso dano ao DNA qualitativamente e quantitativamente (HARIHARAKRISHNAN et al., 2009).

Estudos *in vitro* têm sido conduzidos utilizando o ensaio do citoma na avaliação dos efeitos de compostos da dieta na estabilidade genômica (BULL et al., 2011; FENECH, 2006; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Nesses ensaios de mutagenicidade, utilizando linhagens celulares, é importante levar em consideração a origem da linhagem estudada, seu *status* genético relacionado ao controle da indução de apoptose, bem como a concentração do agente na cultura, uma vez que esses fatores podem interferir na resposta ao estresse mutagênico produzido (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

Neste trabalho, o ensaio do citoma foi realizado com o intuito de observar a capacidade de indução de danos ao DNA de células HepG2 tratadas com amostras provenientes de duas variedades de mandioca, tanto cruas quanto cozidas. Além dos micronúcleos, outros biomarcadores como brotos nucleares e pontes nucleoplasmáticas são observados. As análises foram feitas a partir dos valores de porcentagem de células binucleadas e do Índice de Divisão Nuclear (NDI “nuclear division index”).

Micronúcleos podem resultar de mecanismos, tanto genéticos quanto epigenéticos, da exposição a agentes clastogênicos ou aneugênicos (KIRSCH-VOLDERS et al., 2011). Células HepG2 apresentam naturalmente uma instabilidade genômica com tendência a formação de micronúcleos, visto serem provenientes de hepatoblastoma (MAIER et al., 2010; MAJER et al., 2004). Nesse trabalho, o grupo controle negativo mostrou, em 1000 células binucleadas, valor em média de micronúcleos em torno de 15 (Figuras 23, 24 e 25). Este valor está de acordo com os trabalhos de Chequer (2008), bem como, Tsuboy e colaboradores (2007) que observaram, em 1000 células HepG2 binucleadas, um número de micronúcleos no grupo controle variando de 14 a 20.

Nos grupos tratados, com amostras de mandioca (0,1; 0,5; 1,0 e 5,0 µg/mL), tanto brava quanto mansa, independente do cozimento, o número de micronúcleos em relação ao grupo controle negativo foi um pouco maior, mas estatisticamente não significativo (Figuras 23, 24 e 25), o que pode ser indicativo de interferência mutagênica no DNA dessas células. O cozimento não reduziu o número de micronúcleos, mostrando que compostos existentes nas amostras após o aquecimento também podem gerar danos ao DNA celular. Por outro lado, em todos os grupos de tratamento, os números de brotos nucleares (Figuras 26, 27 e 28) e pontes nucleoplasmáticas (Figuras 29, 30 e 31) encontrado foram menores que no grupo controle, mas estatisticamente não significativo, desta forma, não se confirma a presença de efeito clastogênico ou aneugênico nessas células quando submetidas ao tratamento com amostras de folhas e tucupi de mandioca nas diferentes concentrações.

A mutagenicidade dos produtos químicos da família de cianeto tem sido investigada, em ensaios de mutagenicidade *in vitro*, na indução de mutação em bactérias e em linhagem de células de mamíferos, utilizando uma variedade de métodos com ou sem indução metabólica. Esses ensaios foram conduzidos a partir dos ensaios de citotoxicidade, utilizando as maiores concentrações citotóxicas.

Assim, em ensaios com linhagem TA100 de *Salmonella typhimurium*, um resultado brevemente positivo de mutagenicidade com cianeto, na forma de KCN, foi obtido por Kushi e colaboradores (1983), o qual não foi reproduzido em testes posteriores. Estudos realizados por Kubo e colaboradores (2002) também em

linhagens de *S. typhimurium*, cianeto nas concentrações de 0,01 ou 1,0 mM, na forma de KCN, não induziu mutações reversas nas linhagens TA98 ou TA100, com ou sem ativação metabólica.

Ainda, cianeto, na forma de NaCN, nas linhagens TA97a, TA98, TA100, TA1535, com e sem ativação metabólica, também não apresentou resposta mutagênica (NTP, 1993). O teste de Ames em linhagens TA1535, TA1537, TA1538, TA98 e TA1535 de *S. typhimurium* para detecção de mutações, com ou sem ativação metabólica, não indicou atividade mutagênica para o HCN testado por esse ensaio (ECETOC, 2007). Ensaio de mutação genética, em células de hamster chinês V79 *in vitro*, também foram realizados com cianeto na forma de KCN, cujas concentrações foram pré determinadas em ensaios de citotoxicidade, e revelaram que quando expostas por 2 horas e 24 horas, sem ativação metabólica, nenhuma resposta mutagênica foi observada nessas células (ECEOTEC, 2007).

Os resultados obtidos nos trabalhos supracitados, de acordo com os resultados encontrados nesse trabalho, concordam que o cianeto, não apresentou, em diferentes concentrações testadas, potencial para induzir mutações genéticas, mas apresenta potencial genotóxico. Medidas das rupturas dos filamentos de DNA dão informações limitadas sobre a genotoxicidade e quebras na fita do DNA podem representar efeito direto do agente nocivo, mas elas podem ser rapidamente corrigidas, não sendo mutagênicas (COLLINS, 2004).

Danos produzidos pela mandioca, nas duas variedades estudadas independente do cozimento, ao DNA de células HepG2 foram observados pelo ensaio do cometa, bem como a presença de micronúcleos em células HepG2, também tratadas com essas amostras de mandioca em diferentes concentrações, indicam dano ao DNA dessas células, porém, a ausência de brotos nucleares, pontes nucleoplasmáticas, número significativo de MN e resultados estatísticos significativos em relação ao grupo controle negativo, não nos permitem afirmar presença de mutagenicidade.

O consumo de mandioca processada inadequadamente pode levar à exposição de cianeto. A toxicidade produzida pela dieta a base de mandioca depende do tipo de processamento realizado para extração de compostos

cianogênicos, dos níveis de glicosídeos cianogênicos nos produtos consumidos, do tipo de glicosídeos cianogênicos presentes, quantidade de mandioca consumida, estado nutricional do consumidor, quantidade de proteína consumida, quantidade de produtos detoxificados formados no corpo (CAROD-ARTAL et al, 1999; NAMBISAN, 2011).

Os danos aqui observados pelo ensaio do cometa, em uma primeira análise, podem estar transitoriamente presentes como intermediários formados durante o reparo de lesões no DNA (ZEGURA; SEDMAK; FILIPC, 2003). Por outro lado, a detecção de dano observada pelo aumento do número de micronúcleos é um indicio de mutagenicidade, uma vez que compostos cianogênicos podem interferir no DNA a partir da produção de adutos exocíclicos, principalmente quando a capacidade de detoxificação for excedida (GARCÍA-ESCUADERO; GARDINI; IZQUIERDO, 2008; RICORDY et al., 2002; WINTER; SEGALL; HADDON, 1986), porém, os mecanismos moleculares desses compostos induzindo toxicidade em células HepG2 ainda não são elucidados, requerendo estudos futuros.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

No presente trabalho, foi investigado o potencial citotóxico, genotóxico e mutagênico de diferentes concentrações de folhas e tucupi extraídos de duas variedades de mandioca, cruas e cozidas, em cultura de células HepG2.

Com base nos resultados obtidos, pode-se concluir que:

- As folhas das variedades de mandioca continham após o cozimento quantidades maiores de cianeto total;
- As folhas de ambas as variedades de mandioca continham após o cozimento quantidades menores de cianeto livre;
- O tucupi de ambas as variedades de mandioca continha após o cozimento quantidades menores de cianeto total e livre;
- A quantidade de cianeto total presente nas amostras de tucupi cruas da variedade brava foi superior a quantidade encontrada nas folhas da mesma variedade;
- O cozimento não foi suficiente para extrair todo o conteúdo cianogênico das amostras de mandioca;
- Os resultados de viabilidade celular mostraram que, de maneira geral, a viabilidade de células HepG2 é inversamente proporcional a concentração utilizada;
- O cozimento das amostras de mandioca, de maneira geral, aumentou a viabilidade de células HepG2;
- O KCN nas concentrações utilizadas foi genotóxico em células HepG2;
- As amostras de mandioca brava nas concentrações utilizadas foram genotóxicas em células HepG2;
- As amostras de mandioca mansa cozidas em duas concentrações utilizadas foram genotóxicas em células HepG2;

-
- As amostras de mandioca nas concentrações utilizadas foram menos genotóxicas do que KCN, nas mesmas concentrações, em células HepG2;
 - As amostras de mandioca nas concentrações utilizadas não foram mutagênicas em células HepG2;
 - O cozimento das amostras de mandioca não diminuiu os danos observados nos ensaios do cometa em células HepG2;
 - As amostras de mandioca, independente do cozimento, não induziram mutagenicidade em células HepG2;
 - Há necessidade de mais estudos genotóxicos e mutagênicos que possam avaliar amplamente o potencial tóxico da mandioca.

**REFERÊNCIAS
BIBLIOGRÁFICAS**

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAMS, C.; MURRIETA, R. S.; SANCHES, R. A. Agricultura e alimentação em populações ribeirinhas das várzeas do Amazonas: novas perspectivas. *Ambiente e sociedade*, Campinas, v.8, n.1, p. 65 - 86, 2005.

AGOSTINI, M. R. *Produção e Utilização de Farinha de Mandioca Comum Enriquecida com Adição das Próprias Folhas Desidratadas para Consumo Alimentar*. 2006. 84 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) – Faculdade de Ciências Agrônomas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2006.

AMORIM, S. L.; MEDEIROS, R. M. T.; RIET-CORREA, F. Intoxicações por plantas cianogênicas no Brasil. *Ciência Animal*, Goiás, v. 16, n. 1, p. 17 - 26, 2006.

ARIAS, E.R. A.; ARIAS, S.M.S.; MARTINS; C.S.; PEREIRA, F.A R.; OTSUBO, A. A. Avaliação da produtividade, tempo de cozimento e padrão de massa cozida de oito cultivares de mandioca tipo mesa, em Dourados - MS. *Ensaio e Ciência*, Campo Grande, v.5, n.2, p.11 - 16, 2001.

AZQUETA, A.; LORENZO, Y.; COLLINS, A. R. In vitro comet assay for DNA repair: a warning concerning application to cultured cells. *Mutagenesis*, Swansea, v. 24, n. 4, p. 379 - 381, 2009.

BASKIN, S. I.; PORTER, D. W.; ROCKWOOD, G. A.; ROMANO, J. A.; PATEL H, C.; KISER, R. C.; COOK, C. M.; TERNARY, A. L. In vitro and in vivo comparison of sulfur donors as antidotes to acute cyanide intoxication. *Journal of applied toxicology*, Chichester, v. 19, n. 3, p. 173 - 183, 1999.

BAYOUMI, S. A. L.; ROWAN, M. G.; BEECHING, J. R.; BLAGBROUGH, I. S. Constituents and secondary metabolite natural products in fresh and deteriorated cassava roots. *Phytochemistry*, New York, v. 71, n. 5 - 6, p. 598-604, 2010

BHATTACHARYA, R.; RAO, P. V. L. Cyanide induced DNA fragmentation in mammalian cell cultures. *Toxicology*, Limerick, v. 123, n. 3, p. 205 - 215, 1997.

BHATTACHARYA, R.; RAO, P. V. L.; PARIDA, M. M.; JANA, A. M. Antidotal efficacy of antioxidants against cyanide poisoning in vitro. *Defence Science Journal*, New Delhi, v. 49, n. 1, p. 55 - 63, 1999.

BHATTACHARYA, R.; RAO, P. V. L.; VIJAYARAGHAVAN, R. In vitro and in vivo attenuation of experimental cyanide poisoning by α -ketoglutarato. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 218, n. 1 - 3, p. 185 - 195, 2002.

BOBY, R.G.; INDIRA, M. The impact of cyanoglycoside rich fraction isolated from cassava (*Manihot esculenta*) on alcohol induced oxidative stress. *Toxicol*, Oxford, v. 42, n. 4, p. 367 - 372, 2003.

BONASSI, S.; ZNAOR A.; CEPPI M.; LANDO C.; CHANG W. P.; HOLLAND N.; KIRSCH-VOLDERS M.; ZEIGER E.; , BAN S.; BARALE ROBERTO.; BIGATTI M.; BOLOGNESI C.; CEBULSKA-WASILEWSKA A.; FABIANOVA E.; FUCIC A.; HAGMAR L.; JOKSIC G.; MARTELLI A.; MIGLIORE L.; MIRKOVA E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO A.; NORPPA H.; FENECH M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. *Carcinogenesis*, Oxford, v. 28, n. 3, p. 625 – 631, 2007.

BOPP, S.K.; LETTIERI, T. Comparison of four different colorimetric and fluorometric cytotoxicity assays in a zebrafish liver cell line. *Bone Mineral Content Pharmacology*, London, v.8, n.8, p. 1 - 11, 2008.

BOWDEN, R. D.; BUCKWALTER, M. R.; MCBRIDE, J. F.; JOHNSON, D. A.; MURRAY, B. K.; O'NEILL, K. L. Tail profile: a more accurate system for analyzing DNA damage using the comet assay. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 537, n. 1, p. 1 - 9, 2003.

BRENNER, H.; ROTHENBACHER, D.; ARNDT, V. *Epidemiology of stomach cancer. Methods in Molecular Biology*, Clifton, v. 472, n. 2, p. 467 - 477, 2009.

BULL, C. F.; BEETSTRA-HILL, S.; BENASSI-EVANS, B. J.; CROTT, J. W.; KIMURA, M.; TEO, T.; WU, J.; FENECH, M. F. Application and adaptation of the in vitro micronucleus assay for the assessment of nutritional requirements of cells for DNA damage prevention. *Mutagenesis*, Swansea, v. 26, n. 1, p. 193 - 197, 2011.

CARLSSON, L.; MLINGI, N.; JUMA, A.; RONQUIST, G.; ROSLING, H. Metabolic fates in humans of linamarin in cassava flour ingested as stiff porridge. *Food and Chemical Toxicology*, Exeter, v. 37, n. 4, p. 307- 312, 1999.

CAROD-ARTAL, F.J.; VARGAS, A. P.; DEL NEGRO, C. Spastic paraparesis due to long term consumption of wild cassava (*Manihot esculenta*): a neurotoxic model of motor neuron disease. *Revista de Neurologia*, Barcelona, v. 29, n. 7, p. 610 – 613, 1999.

CASALEGNO, M.; BENFENATI, E.; SELLO, G. Identification of Toxifying and Detoxifying Moieties for Mutagenicity Prediction by Priority Assessment. *Journal Chemical Information and modeling*, Washington, D.C., v. 51, n. 7, p. 1564 - 1574, 2011.

CASARETTO, L.; SOUSA, P. L. R.; MARI, J.J. Chemotherapy versus support cancer treatment in advanced gastric cancer: A meta-analysis. *Brasilian Journal of Medical Research*, São Paulo, v. 39, p. 431 - 440, 2006.

CASTANEDA, R.; PELAEZ, A.; MARQUEZ, M, E.; ABAD, P. Centered reduced moments and associate density functions applied to alkaline comet assay. *Journal of Biomedical Optics*, Bellingham, WA, v. 10, n. 3, p. 1 - 8, 2005.

CEMELI, E., BAUMGARTNER, A.; ANDERSON, D. Antioxidants and the comet assay. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 681, n.1, p.51 - 67, 2009.

CEPPI, M.; BIASOTTI, B.; FENECH, M.; BONASSI, S. Human population studies with the exfoliated buccal micronucleus assay: Statistical and epidemiological issues. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 705, n. 1, p. 11 - 19, 2010.

CEREDA, M. P.; MATTOS, M. C. Y. Linamarin – the toxic compound of cassava. *Journal of Venomous Animals and Toxins*, Botucatu, v. 2, n. 1, p. 6 - 12, 1996.

CHEQUER, F. M. *Utilização do Teste de Micronúcleo na Avaliação da Toxicidade dos Azo Corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 1 e Disperse Red 13*. 2008. 100 f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2008.

CHEQUER, F. M.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, D. P. The azo dyes disperse red 1 and disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 676, n. 1 - 2, p. 83 - 86, 2009.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Estudo do Processo de Fabricação da Farinha de Mandioca. *Embrapa Amazônia Oriental*. Documentos, 267, 1. ed. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2006. 75p.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. Estudo das propriedades físico-químicas do tucupí. *Ciência, Tecnologia e Alimentos*, Campinas, v. 27, n. 3, p. 437 - 440, 2007.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O. Determinação do cianeto total nas farinhas de mandioca do grupo seca e d'água comercializadas na cidade de Belém-PA. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*, Ponta Grossa, v. 2, n. 2, p. 96-102, 2008.

CHISTÉ, R. C.; COHEN, K. O.; OLIVEIRA, S. S. Quantificação de cianeto total nas etapas de processamento das farinhas de mandioca dos grupos seca e d'água. *Acta Amazonica*, Manaus, v. 40, n. 1, p. 221-226, 2010.

CODEX ALIMENTARIUS COMMISSION. Relatório da 8ª Sessão do Comitê de Coordenação Codex para a África, Cairo. FAO/WHO, Roma, Itália, 1988.

COLLINS. A. R. Molecular epidemiology in cancer research. *Molecular Aspects of Medicine*, Elmsford, v. 19, n. 6, p. 359 - 432. 1998.

COLLINS. A. R. The comet assay for DNA damage and repair: principles, applications and limitations. *Molecular Biotechnology*, Totowa, v. 26, n. 3, p. 249 - 261, 2004.

COMPARE, D.; ROCCO, A.; NARDONE, G. Risk factors in gastric cancer. *European Review for Medical and Pharmacological Sciences*, Roma, v. 14, n. 4, p. 302 - 308, 2010.

DONATO, M. T.; LAHOZ, A.; CASTELL, J. V.; GÓMEZ-LECHÓN, M. J. Cell lines: a tool for in vitro drug metabolism studies. *Current Drug Metabolism*, Hilversum, v. 9, n. 1, p. 1 - 11, 2008.

DORÉA, J.G. Cassava cyanogens and fish mercury are high but safety consumed in the diet of native Amazonas. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, New York, v. 57, n. 3, p. 248 - 256, 2004.

DUAN, H.; LENG, S.; PAN, Z.; DAI, Y.; NIU, Y.; HUANG, C.; BIN, P.; WANG, Y.; LIU, Q.; CHEN, W.; ZHENG, Y. Biomarkers measured by cytokinesis-block micronucleus cytome assay for evaluating genetic damages induced by polycyclic aromatic hydrocarbons. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 677, n. 1 - 2, p. 93 - 99, 2009.

ECETOC - European Centre for Ecotoxicology and Toxicology of Chemicals. Cyanides of Hydrogen, Sodium and Potassium, and Acetone Cyanohydrin (CAS No. 74-90-8, 143-33-9, 151-50-8 and 75-86-5). Jacc Report, Brussels, v. 1, n. 53. P. 1 - 375, 2007.

EICHHOLZER, M. Nutrition and Cancer. *Therapeutish Umschau*, Bern, v. 57, n. 3, p. 146 - 151, 2000.

EL-SHARKAWY, M. A. Cassava biology and physiology. *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 56, n. 4, p. 481 - 501, 2004.

EL-ZEIN, R.; FENECH, M.; LOPEZ, M. S.; SPITZ, R.; ETZEL, C. J. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay biomarkers identify lung cancer cases amongst smokers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prevention*, Philadelphia, PA, v. 17, n. 5, p. 1111 - 1119, 2008.

FAN, L. L.; SUN, G.P.; WEI, W.; WANG, Z. G.; GE, L.; FU, WEI, Z.; WANG, H. Melatonin and doxorubivin synergistically Induce cell apoptosis in human hepatoma cell lines. *World Journal of Gastroenterology*, Beijing, v. 16, n. 12, p. 1473 -1481, 2010.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. Cytokinesis-blocked micronucleus assay involves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 600, n 1 - 2, p. 58 - 66, 2006.

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

FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N. Dietary cancer and prevention using antimutagens. *Toxicology*, Limerick, v. 198, n. 1-3, p. 147 - 159, 2004.

FORCHHAMMER, L.; JOHANSSON, C.; LOFT, S.; MOLLER, L.; GODSCHALK, R. W. L.; LANGIE, S. A. S.; JONES, G. D. D.; KWOK, R. W. L.; COLLINS, A. R.; AZQUETA, A.; PHILLIPS, D. H.; SOZERI, O.; STEPNIK, M.; PALUS, J.; VOGEL, U.; WALLIN, H.; ROUTLEDGE, M. N.; HANDFORTH, C.; ALLIONE, A.; MATULLO, G.; TEIXEIRA, J. P.; COSTA, S.; RISO, P.; PORRINI, M.; MØLLER, P. Variation in the measurement of DNA damage by comet assay measured by the ECVAG inter-laboratory validation trial. *Mutagenesis*, Swansea, v. 25, n. 2, p. 113 - 123, 2010.

FORSLUND, K.; MORANT, M.; JØRGENSEN, B.; OLSEN, C. E.; ASAMIZU, E.; SATO, S.; TABATA, S.; BAK, S. Biosynthesis of the nitrile glucosides Rhodiocyanoside A and D and the cyanogecic glucosides lotautralin and linamarin in *Lotus japonicus*. *Plant Physiology*, Lancaster, PA, v. 135, n. 1, p. 71 - 84, 2004.

FRESCO, P.; BORGES, F.; DINIZ, C.; MARQUEZ, M. P. M. New insights on the anticancer Properties of dietary polyphenols. *Medicinal Research Reviews*, New York, v. 26, n. 6, p. 747 - 766, 2006.

GARCÍA-ESCUADERO, V.; GARDINI, R.; IZQUIERDO, M. Glioma regression *in vitro* and *in vitro* by a suicide combined treatment. *Molecular Cancer Research*, Philadelphia, PA, v. 6, n. 3, p. 407 - 417, 2008.

GAROFOLO, A.; AVESANII, C. M.; CAMARGO, K. G.; BARROS, M. E.; SILVA, S. R. J.; TADDEI, J. A. A. C.; SIGULEM, D. M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 17, n. 4, p. 491 - 505, 2004.

GIRENA, F. R.; MOURA, E. F.; NETO, J. T. F.; SILVA, D. T. Diferenciação genética entre possíveis duplicatas no banco de germoplasma de mandioca da Embrapa Amazônia oriental por meio de marcadores microssatélites. In: Seminário de Iniciação Científica da EMBRAPA, 14, 2010, Belém. *Resumos...Belém*: EMBRAPA, 2010. 4 p.

GONZALEZ, C. A.; RIBOLI, E. Diet and cancer prevention: contributions from the European prospective investigation into cancer and nutrition (EPIC) study. *European Journal*, Oxford, v. 46, n. 14, p. 2555 - 2562, 2010.

GUERRA, R. M.; GALLO, C. V. M.; AZEVEDO, G.; MENDONÇA, S. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Revista Brasileira de Cancerologia*, São Paulo, v. 51, n. 3, p. 227 - 234, 2005.

GUILLOUSO, A. Liver Cell Models in in Vitro Toxicology. *Environmental Health Perspectives*, North Carolina, v. 106, s. 2, p. 511 - 532, 1998.

HARIHARAKRISHNAN, J.; SATPUTE, R. M.; PRASAD, G. B. K.S.; BHATTACHARYA, R. Oxidative stress mediated cytotoxicity of cyanide in LLC-MK2 cells and its attenuation by alpha-ketoglutarate and N-acetyl cysteine. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 185, n. 2, p. 132 - 141, 2009.

HARANGI, M.; REMENYIK, E.; SERES, I.; VARGAS, Z.; KATONA, E.; PARAGH, G. Determination of DNA damage induced by oxidative stress in hyperlipidemic patients. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 513, n. 1 - 2, p. 17 - 25, 2002.

HARANGI, M.; SERES, I.; VARGAS, Z.; EMRI, G.; SZILVÁSSY, Z.; PARAGH, G.; REMENYIK, E. Atorvastatin effect on high-density lipoprotein-associated paraoxonase activity and oxidative DNA damage. *European Journal of Clinical Pharmacology*, Berlin, v. 60, n. 10, p. 685 - 691, 2004.

HELBIG, E.; BUCHWEITZ, M. R.; GIGANTE, D.; GIGANTE, P. Análise dos teores de ácidos cianídrico e fítico em suplemento alimentar: multimistura. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 21, n. 3, p. 323 - 328, 2008.

HENDERSON, L.; WOLFREYS, A.; FEDYK, J.; BOURNER, C.; WINDEBANK, S. The ability of the Comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. *Mutagenesis*, Swansea, v. 13, n. 1, p. 89 - 94, 1998.

HOELZL, C.; KNASMULLER, S.; MISÍL, M.; COLLINS, A.; DUSINSKÁ, M.; NERSESYAN, A. Use of single cell gel electrophoresis assays for the detection of DNA-protective effects of dietary factors in humans: recent results and trends. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 681, n. 1, p. 68 - 79, 2009.

HRELJAC, I.; ZAJC, I.; LAH, T.; FILIPIC, M. Effects of model organophosphorous pesticides on DNA damage and proliferation of HepG2 cells. *Environmental and molecular mutagenesis*, New York, v. 49, n. 5, p. 360 - 367, 2008.

IARC. Cancer incidence and mortality worldwide in 2008. Disponível em: <<http://www.iarc.fr>>. Acesso em: 10 out. 2010.

IARMARCOVAI, G.; CEPPI, M.; BOTTA, A.; ORSIÈRE, T.; BONASSI, S. Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: A meta-analysis. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 659, n. 3, p. 274 - 283, 2009.

IARMARCOVAI, G.; BONASSI, S.; BOTTA, A.; BAAN, R. A.; ORSIÈRE, T. Genetic polymorphisms and micronucleus formation: A review of the literature. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 658, n. 3, p. 215 - 233, 2008.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Pesquisa de Orçamento Familiar, 2008/09. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em 03 fev. 2012.

IDIBIE, C. A.; DAVIDS, H.; IYUKE, S. E. Cytotoxicity of purified cassava linamarin to a selected cancer cell lines. *Bioprocess Biosystem Engeneer*, Berlin, v. 30, n. 4, p. 261 - 269, 2007.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil – 2010. Disponível em: <<http://www.inca.org.br>>. Acesso em: 10 out. 2010.

JAVITT, N. B. Hep G2 cells as a resource for metabolic studies: lipoprotein, cholesterol, and bile acids. *The Federation of American societies for Experimental Biology Journal*, Bethesda, MD, v. 4, n. 2, p. 161 - 168, 1990.

JIANG, L.; CAO, J.; AN, Y.; GENG, C.; QU, S.; JIANG, L.; ZHONG, L. Genotoxicity of acrylamide in human hepatoma G2 (epG2) cells. *Toxicology in Vitro*, Oxford, v.21, n. 8, p. 1486 - 1492, 2007.

JIN, X.; CHEN, Q.; TANG, S. S.; ZOU, J. J.; CHEN, K. P.; ZHANG, T.; XIAO, X. L. Investigation of quinocetone-induced genotoxicity in HepG2 cells using the comet assay, cytokinesis-block micronucleus test and RAPD analysis. *Toxicology in Vitro*, Oxford, v. 23, n. 7, p. 1209 - 1214, 2009.

JONES, D. C.; GUNASEKAR, P. G.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. Dopamine-induced apoptosis is mediated by oxidative stress and is enhanced by cyanide in differentiated PC12 cells, *Journal of Neurochemistry*, London, v. 74, n. 6, p. 2296 - 2304, 2000.

KAMALU, B.P. Pathological changes in growing dogs fed on a balanced cassava (*Manihot esculenta Crantz*) diet. *British Journal Nutrition*, Wallingford, v. 69, n. 1, p. 921 - 934, 1993.

KAMALU, B. P. The adverse effects of long-term cassava (*Manihot esculenta Crantz*) consumption. *International Journal Food Science Nutrition*, Basingstoke, v. 46, n. 1, p. 65 - 93, 1995.

KIRSCH-VOLDERS, M.; PAL, G.; ELHAJOUJU, A.; LUKAMOWICZ, M.; GONZALEZ, L.; LOOCK, K. V.; DECORDER, I. The in vitro MN assay in 2011: origin and fate, biological significance, protocols, high throughput methodologies and toxicological relevance. *Archives Toxicology*, Berlin, v. 85, n. 8, p. 873 - 899, 2011.

KNASMÜLLER, S.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; KEVEKORDES, S.; DARROUDI, F.; HUBER, W.W.; HOELZL, C.; BICHLER, J.; MAJER, B.J. Use of human-derived liver cell lines for the detection of environmental and dietary genotoxicants: Current state of knowledge. *Toxicology*, Amsterdam, v. 198, n. 1 - 3, p. 315 - 328, 2004.

KOLIND-HANSEN, L.; BRIMER, L. The retail market for fresh cassava root tubers in the European Union (EU): the case of Copenhagen, Denmark--a chemical food safety issue? *Journal of the Science of Food and Agriculture*, London, v. 90, n. 2, p. 252 - 256, 2010.

KUBO, T.; URANO, K.; UTSUMI, H. Mutagenicity characteristics of 255 environmental chemicals. *Journal Health Science*, Tokio, v. 48, n. 6, p. 545 - 554, 2002.

KUMARAGURUPARAN, R.; SUBAPRIYA, R.; VISWANATHAN, P.; NAGINI, S. Tissue lipid peroxidation and antioxidant status in patients with adenocarcinoma of the breast. *Clinica Chimica Acta*, Amsterdam, v. 325, n. 1 - 2, p. 165 - 170, 2002.

KUSHI, A.; MATSUMOTO, T.; YOSHIDA, D. Mutagen from the gaseous phase of protein pyrolyzate. *Agricultural and Biological Chemistry*, Tokio, v. 47, n. 1, p. 1979 - 1982, 1983.

LADEIRA, M. S. P.; RODRIGUES, M. A. M.; FREIRE-MAIA, D. V.; SALVADORI, D. M. F. Use of Comet assay to assess DNA damage in patients infected by *Helicobacter pylori*: comparisons between visual and image analyses. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 586, n. 1, p. 76 - 86, 2005.

LEE, T. K. W.; LAU, T. C.M.; NG, I. O. L. Doxorubicin-induced apoptosis and chemosensitivity in hepatoma cell lines. *Cancer Chemotherapy Pharmacology*, Berlin, v. 49, n. 1, p. 78 - 86, 2002.

LEMOS, F. L. *Recuperação eletrolítica de cobre, ouro e prata de efluentes de mineração de ouro*. 2008. 172 f. Tese (Doutorado em Engenharia Metalúrgica e de Materiais) - Faculdade de Engenharia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2008.

LESTARI, F.; HAYES, A.J.; GREEN, A. R.; MARKOVIC, B. In vitro cytotoxicity of selected chemicals commonly produced during fire combustion using human cell lines. *Toxicology In Vitro*, Oxford, v.19, n. 5, p. 653 - 663, 2005.

LI, J.; LI, H.; ZHU, L.; SONG, W.; LI, R.; WANG, D.; DOU, K. The adenovirus-mediated linamarase/linamarin suicide system: A potential strategy for the treatment of hepatocellular carcinoma. *Cancer Letters*, Amsterdam, v. 289, n. 2, p. 217 - 227, 2010.

LI, L.; PRABHAKARAN, Y.; SHOU, Y.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. Oxidative stress and cyclooxygenase-2 induction mediate cyanide-induced apoptosis of cortical cells. *Toxicology and Applied Pharmacology*, New York, v. 185, n. 1, p. 55 - 63, 2002.

LINDBERG, H. K.; WANG, X.; JARVENTAUS, H.; FALCK, G. C.; NORPPA, H.; FENECH, M. Origin of nuclear buds and micronuclei in normal and folate-deprived human lymphocytes. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 617, n. 1 - 2, p. 33 - 45, 2007.

LOPES, A M. *Avaliação da dose letal (DL₅₀) oral e efeitos metabólicos da linamarina extraída de mandioca, em ratos*. 2001. 85 f. Tese (Doutorado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agronômicas, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu, 2001.

MADUAGWU, E. N.; UMOH, I. B. Detoxification of cassava leaves by simple traditional methods. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 10, n. 2 - 3, p. 245 - 248, 1982.

MAIER, K.; HOFMANN, U.; REUSS, M.; MAUCH, K. Dynamics and control of the central carbon metabolism in hepatoma cells. *BMC Systems Biology*, London, v. 4, n. 54, p. 1 - 28, 2010.

MAJER, B. J.; MERSCH-SUNDERMANN, V.; DARROUDI, F.; LAKY, B.; DE WIT, K.; KNASMULLER, S. Genotoxic effects of dietary and lifestyle related carcinogens in human derived hepatoma (HepG2, Hep3B) cells. *Mutation Research*, Amsterdam, v.551, n.1 - 2, p.153 - 166, 2004.

MANZANO, H.; SOUZA, A.; GÓRNIK, S. Exposição cianídrica em suínos: Uma abordagem dos parâmetros toxicocinéticos utilizando o tiocianato como biomarcador. *Brazilian Journal of Veterinary Research and Animal Science*, São Paulo, v. 43, s. 1, p. 93 - 101, 2006.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. *Toxicology*, Amsterdam, v. 198, n. 1 - 3, p. 329 - 340, 2004.

MILLS, E. M.; GUNASEKAR, P. G.; PAVLAKOVIC, G.; ISOM, G. E. Cyanide-induced apoptosis and oxidative stress in differentiated PC12 cells. *Journal of Neurochemistry*, London, v. 67, n. 3, p. 1039 - 1046, 1996.

MOORE, P.; YEDJOU, C. G.; TCHOUNWOU, P. B. Malation-Induced oxidative stress, cytotoxicity, and genotoxicity in human liver carcinoma (HepG2) cells. *Environmental Toxicology*, New York, v. 25, n. 3, p. 221 - 226, 2010.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal Immunological, Methods*, Amsterdam, v. 65, p. 55 - 63, 1983.

MOUTINHO, V. Epidemiologic aspects of gastric cancer in Belém. *Arquivos Brasileiros de Cirurgia Digestiva*, São Paulo, v. 2, n. 1, p. 204 - 213, 1986.

MUGHAL, A.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G. B. Micronucleus and comet assay in the peripheral blood of juvenile rat: Establishment of assay feasibility, time of sampling and the induction of DNA damage. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 700, n. 1 - 2, p. 86 - 94, 2010.

MURRIETA, R. S.; BAKRI, M. S.; ADAMS, C.; OLIVEIRA, P. S.; STRUMPF, R. Consumo alimentar e ecologia de populações ribeirinhas em dois ecossistemas amazônicos: um estudo comparativo. *Revista de Nutrição*, Campinas, v. 21, n. 1, p. 123 - 133, 2008.

NAMBISAN, B. Strategies for elimination of cyanogens from cassava for reducing toxicity and improving food safety. *Food and Chemical Toxicology*, Exeter, v. 49, n. 3, p. 690 - 693, 2011.

NASSAR, N. M.; HASHIMOTO, D. Y.; FERNANDES, S. D. Wild Manihot species: botanical aspects, geographic distribution and economic value. *Genetic and Molecule Research*, Ribeirão Preto, v. 7, n. 1, p. 16 - 28, 2008.

NASSAR, N.; ORTIZ, R. Breeding cassava to feed the poor. *Scientific American Magazine*, New York, v. 302, n. 5, p. 78 - 82, 2010.

NGUDI, D. D.; KUO, Y, H.; LAMBEIN, F. Cassava cyanogens and free amino acids in raw and cooked leaves. *Food and Chemical Toxicology*, Exeter, v. 41, n. 8, p. 1193 - 1197, 2003.

NTP – National Toxicology Program. Toxicity Studies of Sodium Cyanide (CAS No. 143-33-9) Administered by Dosed Water to F344/N Rats and B6C3F1 Mice. *Toxicity Report Series*. North Carolina, v. 37, n. 16, p. 1 - 64, 1993.

OLUWOLE, O.S.A.; ONABOLU, O.A.; COLGREAVE, I.A.; ROSLING, H.; PERSON, A.; LINK, H. Low prevalence of ataxic polyneuropathy a community with high exposure to cyanide from cassava foods. *Journal of Neurology*, Berlin, v. 249, n. 8, p. 1034 - 1040, 2002.

OLUWOLE, O.S.A.; ONABOLU, O.A.; COLGREAVE, I.A.; ROSLING, H.; PERSON, A.; LINK, H. Incidence of endemic ataxia polyneuropathy and its relation to exposure to cyanide in a Nigerian community. *Journal of Neurology, Neurosurgery and Psychiatry*, London, v. 74, n. 10, p. 1417 - 22, 2003.

OZOLUA, R. I.; OKOLIE, N. P.; EBEIGBE, Q. B.; KARIKARI, N. Effects of sub-chronic oral cyanide on endothelial function in rabbit aortic rings. *Human & Experimental Toxicology*, London, v.26, n. 2, p. 105 - 110, 2007.

PADMAJA, G. Cyanide detoxification in cassava for food and feed uses. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, London, v. 35, n. 4, p. 299 - 239, 1995.

PERES, L. A. B.; DELFINO, V. D. A.; MOCELIN, A. J.; TUTIDA, L. A.; FÁVERO, M. E.; MATSUO, T. Padronização do Teste do MTT em Modelo de Preservação a Frio como Instrumento de Avaliação da Viabilidade Celular Renal. *Jornal Brasileiro de Nefrologia*, São Paulo, v. 30, n. 1, p.48 - 53, 2008.

PITTOZZI, V.; PALLOTTA, S.; BALZI, M.; BUCCIOLINI, M.; BECCIOLINI, A.; DOLARA, P.; GIOVANNELLI, L. Calibration of the comet assay for the measurement of DNA damage in mammalian cells. *Free Radical Research*, London, v.40, n.11, p. 1149 – 1154, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; FLOWER, R. J. *Farmacologia*. 4. ed. São Paulo: Elsevier Editora Ltda, 2008. 829 p.

RAO, S. B. S.; SCREEDEVI, M. V.; RAO, N. B. Cytoprotective and antigenotoxic potential of mangiferin, a glucosylxanthone against cadmium chloride induced toxicity in HepG2 cells. *Food and chemical Toxicology*, Exeter, v. 47, n. 3, p. 592 - 600, 2009.

RESENDE, A. L.; MATTOS, I. E.; KOIFMAN, S. Dieta e câncer gástrico: aspectos históricos associados ao padrão de consumo alimentar no estado do Pará. *Revista de Nutrição*, Campinas, v.19, n. 4, p. 511 - 519, 2006.

RICORDY, R.; GENSABELLA, G.; CACCI, E.; AUGUSTI-TOCCO, G. Impairment of cell cycle progression by aflatoxin B1 in cell lines. *Mutagenesis*, Swansea, v. 17, n. 3, p. 241 - 249, 2002.

ROBERTO, M. M. *Avaliação do Potencial Antimutagênico de Extrato Etanólico de Propólis Verde e de Bassharis dracunculifolia (Asteraceae), Por meio de Sistema-Teste de Alium cepa e Células de Mamíferos (HTC)*. 2009. 116 f. Dissertação (Mestrado em Agronomia) - Faculdade de Ciências Agrônomas de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2009.

ROGERO, S.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, A. S. Teste in vitro de citotoxicidade: Estudo Comparativo entre duas metodologias. *Materials Research*, São Carlos, v. 6, n. 3, p. 317-320, 2003.

SANT'ANA, A. F.; DOMENE, S. M. A. Teores de glicosídeos cianogênicos em derivados de mandioca determinados por protocolo adaptado ao laboratório de micronutrientes. *Anais do XIII Encontro de Iniciação Científica da PUC*, Campinas, p. 1 - 3, 2008.

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*, London, v. 30, n. 6, p. 629 - 799, 2000.

SCHATZKIN, A.; SUBAR, A. F.; MOORE, S.; PARK, Y.; POTISCHMAN, N.; THOMPSON, F. E.; LEITZMANN, M.; HOLLENBECK, A.; MORRISSEY, K. G.; KIPNIS, V. Observational epidemiologic studies of nutrition and cancer: The next generation (with better observation). *Cancer Epidemiology, Biomarkers and Prevention*, Philadelphia, PA, v.18, n. 4, p.1026 - 1032, 2009.

SEVERIN, I.; DUMONT, C.; JONDEAU-CABATON, A.; GRAILLOT, V.; CHAGNON, M. C. Genotoxic activities of the food contaminant 5-hydroxymethylfurfural using different in vitro bioassays. *Toxicology Letters*, Amsterdam, v. 192, n. 2, p. 189 - 194, 2010.

SHANG, Y. Z.; QIN, B. W.; CHENG, J. J.; MIAO, H. Effect of *Scutellaria* flavonoids on KCN-induced damages in rat pheochromocytoma PC12 cells. *The Indian Journal of Medical Research*, New Delhi, v. 127, n.6, p. 610 - 615, 2008.

SHOU, Y.; GUNASEKAR, P. G.; BOROWITZ, J. L.; ISOM, G. E. Cyanide-induced apoptosis involves oxidative-stress-activated NF-kappaB in cortical neurons. *Toxicology and Applied Pharmacology*, New York, v. 164, n. 2, p. 196 - 205, 2000.

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.

SIRITUNGA, D.; SAYRE, R. Engineering cyanogens synthesis and turnover in cassava (*Manihot esculenta*). *Plant Molecular Biology*, Dordrecht, v. 56, n. 4, p. 661 - 669, 2004.

SOLER-MARTÍN, C.; RIERA, J.; SOANE, A.; CUTILLAS, B.; A,BROSIO, S.; BOADAS-VAELLO, P.; LIORENS, J. The targets of acetone cyanohydrin neurotoxicity in the rat are not the ones expected in an animal model of konzo. *Neurotoxicology and Teratology*, Elmsford, v. 32, n. 2, p. 289 - 294, 2010.

SORNYOTHA, S.; KYU, K. L.; RATANAKHANOKCHAI, K. An efficient treatment for detoxification process of cassava starch by plant cell wall-degrading enzymes. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, Osaka, v. 109, n. 1, p. 1 - 9, 2010.

SOTO-BLANCO, B.; GÓRNIK, S. L. Toxic effects of prolonged administration of leaves of cassava (*Manihot esculenta* Crantz) to goats. *Experimental and Toxicology Pathology*, Jena, v. 62, n. 4, p. 361 - 366, 2010.

SOUZA, M. L.; MENEZES, H. C. Processamento de amêndoa e torta de castanha-do-Brasil e farinha de mandioca: parâmetros de qualidade. *Ciência tecnologia e Alimento*, Campinas, v. 24, p. 120 - 128, 2004.

SPITELLER, P.; KEM, W.; REINER, J.; SPITELLER, G. Aldehyde lipid peroxidation products derived from linoileic acid. *Biochimistry Biophysics Acta*, Amsterdam, v. 1531, n. 3, p. 188 - 208, 2001.

SUTANDYO, N. Nutritional carcinogenesis. *Acta Medica Indonesiana*, Jakarta, v. 42, n. 1, p. 36 - 42, 2010.

TEPES, B. Can gastric cancer be prevented? *Journal of Physiology And pharmacology*, Krakow, v. 60, s. 7, p. 71 - 77, 2009.

TERREDAS, M.; MARTÍN, M.; TUSELL, L.; GENESCÀ, A. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell? *Mutation Research*, Amsterdam, v. 705, n.1, p. 60 - 67, 2010.

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

THIERENS, H.; VRAL, A. The micronucleus assay in radiation accidents. *Annali dell' Istituto Superiore di Sanità*, Roma, v. 45, n. 3, p. 260 - 264, 2009.

TUDEK, B.; WINCZURA, A.; JANIK, J.; SIOMEK, A.; FOKSINSKI, M.; OLINSKI, R. Involvement of oxidatively damage DNA and repair in cancer development and aging. *American journal of translational Research*, Madison, WI, v. 2, n. 3, p. 254 - 284, 2010.

TSUBOY, M. S.; ANGELI, J.P.F.; MANTOVANI, M. S.; KNASMULLER, S; UMBUZEIRO, G.A.; RIBEIRO, L.R. Genotoxic, mutagenic and cytotoxic effects of the commercial dye CI Disperse Blue 291 in the human hepatic cell line HepG2. *Toxicology in Vitro*, Oxford, v. 21, n. 8, p. 1650 – 1655, 2007.

UHL. M.; HELMA, C.; KNASMULLER, S. Single-cell gel electrophoresis assays with human-derived hepatoma_Hep G2/cells. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 441, n. 2, p. 215 – 224, 1999.

UHL, M.; HELMA, C.; KNASMULLER, S. Evaluation of the single cell gel electrophoresis assay with human hepatoma - Hep G2/cells. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 468, n. 2, p. 213 – 225, 2000.

UTTARA, B.; SINGH, A. V.; ZAMBONI, P.; MAHAJAN, R. T. Oxidative Stress and neurodegenerative diseases: A review of upstream and downstream antioxidant therapeutic options. *Current Neuropharmacology*, Sharjah, v. 7, n. 1, p. 65 - 67, 2009.

VALENTIN-SEVERIN, I.; HEGARAT, L.L.; LHUGUENOT, J.C. BON, A.M.L.; CHAGNON, M. C. Use of HepG2 cell line for direct or indirect mutagens screening: comparative investigation between comet and micronucleus assays. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 536, n. 1-2, p. 79 – 90, 2003.

VALVERDE, M.; ROJAS, E. Environmental and occupational biomonitoring using the Comet assay. *Mutation Research*, Amsterdam, v. 681, n. 1, p. 93 - 109, 2009.

VETTER, J. Plant cyanogenic glycosides. *Toxicon*, Oxford, v. 38, n. 1, p. 11 - 36, 2000.

VOCK, E. C.; VAMVAKAS, S.; GAHLMANN, R.; LUTZ, W. K. Investigation of the induction of DNA double-strand breaks by methylenediphenyl-4-4'-diisocyanate in cultured human lung epithelial cells. *Toxicological Sciences*, Orlando, v. 46, n. 1, p. 83 – 89, 1998.

VOCK, E. C.; LUTZ, W. K.; HORMES, P.; HOFFMAN, H. D.; VAMVAKAS, S. Discrimination between genotoxicity and cytotoxicity in the induction of DNA double-strand breaks in cells treated with etoposide, melphalan, cisplatin, potassium cyanide, Triton X-100, and gamma-irradiation, *Mutation Research*, Amsterdam, v. 413, n. 1, p. 83 - 94, 1998.

WASSON, G. R.; MCKELVEY-MARTIN, J.; DOWNES, C, S. The use of the comet assay in the study of human nutrition and cancer. *Mutagenesis*, Swansea, v. 23, n. 3, p. 153 - 162, 2008.

World Health Organization. Hydrogen cyanide and cyanides: human health aspects. *Concise International Chemical Assessment*. Geneva, 2004 (WHO technical report series, 73).

WINTER, C.K.; SEGALL, H.J.; HADDON, W.F. Formation of cyclic adducts of deoxycytosine with the aldehydes trans-4-hydroxy-2-hexenal and trans-4-hydroxy-2-nonenal in vitro. *Cancer Research*, Baltimore, MD, v. 46, n. 11, p. 5682 - 5686, 1986.

WOBETO, C.; CORRÊA, A. D.; ABREU, C. M. P.; SANTOS, C. D.; PEREIRA, H. V. Antinutrients in the cassava (*Manihot esculenta* Crantz) leaf powder at three ages of the plant. *Ciência Tecnologia e Alimento*, Campinas, v. 27, n. 1, p. 108 - 112, 2007.

YE, N.; QIN, J.; LIU, X.; SHI, W.; LIN, B. Characterizing doxorubicin-induced apoptosis in HepG2 cell using an integrated microfluidic device. *Electrophoresis*, Weinheim, v. 28, n. 7, p. 1146 - 1153, 2007.

ZEGURA, B.; SEDMAK, B.; FILIPC, M. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2. *Toxicon*, Oxford, v. 41, n. 1, p. 41- 48, 2003.

ZHU, L.; XU, Y. J.; DU, F.; QIAN, Z. M. Ginkgolides protect primary cortical neurons from potassium cyanide-induced hypoxic injury. *Experimental Brain Research*, Berlin, v. 179, n. 4, p. 665 - 671, 2007.