

**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 Gregg.

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 Gregg 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 Gregg 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**

<b>Figura 1.</b>	Formação do íon cianeto e ácido cianídrico a partir da degradação do glicosídeo cianogênico linamarina por ação enzimática .....	6
<b>Figura 2.</b>	Fotomicrografia do dano celular em células HepG2 .....	21
<b>Figura 3.</b>	Fotomicrografia de células HepG2 para análise de micronúcleo (MN), ponte nucleoplasmática (NPB) e broto nuclear (NBUD) .....	23
<b>Figura 4.</b>	Quantidade de cianeto (CN <sup>-</sup> ) total (mg/kg de folha) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas .....	26
<b>Figura 5.</b>	Quantidade de cianeto (CN <sup>-</sup> ) livre (mg/kg de folha) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas .....	27
<b>Figura 6.</b>	Quantidade de cianeto (CN <sup>-</sup> ) total (mg/kg de tucupi) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas .....	28
<b>Figura 7.</b>	Quantidade de cianeto (CN <sup>-</sup> ) livre (mg/kg de tucupi) em mandioca das variedades brava e mansa, cruas e cozidas .....	29
<b>Figura 8.</b>	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
<b>Figura 9.</b>	Citotoxicidade de KCN em células HepG2 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações do agente pelo ensaio do MTT .....	31
<b>Figura 10.</b>	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
<b>Figura 11.</b>	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
<b>Figura 12.</b>	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
<b>Figura 13.</b>	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
<b>Figura 14.</b>	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

<b>Figura 15.</b>	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
<b>Figura 16.</b>	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
<b>Figura 17.</b>	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
<b>Figura 18.</b>	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
<b>Figura 19.</b>	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
<b>Figura 20.</b>	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
<b>Figura 21.</b>	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
<b>Figura 22.</b>	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
<b>Figura 23.</b>	Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade brava .....	57
<b>Figura 24.</b>	Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com folha de mandioca variedade mansa .....	58
<b>Figura 25.</b>	Média de micronúcleos (MNs) em 1000 células HepG2 tratadas com tucupi de mandioca variedade brava .....	59

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

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	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
<b>Tabela 2.</b>	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
<b>Tabela 3.</b>	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
<b>Tabela 4.</b>	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
<b>Tabela 5.</b>	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
<b>Tabela 6.</b>	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
<b>Tabela 7.</b>	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
<b>Tabela 8.</b>	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
<b>Tabela 9.</b>	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
<b>Tabela 10.</b>	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
<b>Tabela 11.</b>	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

# 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; TEPE, 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 (CEMELI; 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 3ª 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- $\beta$ -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  $\beta$ -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  $\alpha$ -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).

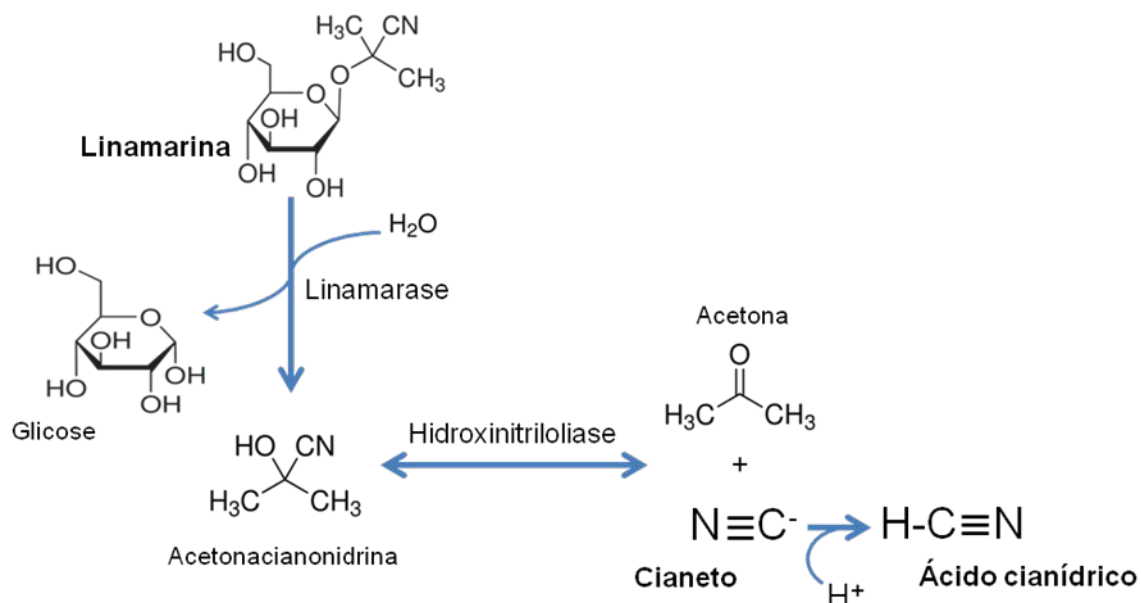


FIGURA 1: Formação do íon cianeto e ácido cianídrico a partir da degradação do glicosídeo cianogênico linamarina por ação enzimática. Adaptado de Vetter, 2000.

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 kongo, 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-a<sub>3</sub>, 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-ESCUADERO; 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. Outra forma, o tiocianato é excretado, principalmente pela urina. A intoxicação aguda só ocorrerá se a capacidade de detoxificação pelo organismo for excedida (GARCÍA-ESCUADERO; 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, glutathione S-transferase, uridina glucuronosil 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.

# 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  $\alpha$ -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 tucupi. *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 vivo* 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 ( $DL_{50}$ ) 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 (Astereceae), 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.; ABROSIO, 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.; GÓRNIAK, 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.



## SUMÁRIO

<b>Resumo .....</b>	<b>i</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Figuras.....</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Tabelas .....</b>	<b>viii</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas .....</b>	<b>ix</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>2</b>
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
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>13</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>16</b>