UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí
(*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) *in vivo***

Juliana Carvalho Ribeiro

Ribeirão Preto

2010

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí
(*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) *in vivo***

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

Área de Concentração: Toxicologia.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Pires
Bianchi**

Orientada: Juliana Carvalho Ribeiro

Ribeirão Preto

2010

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.

Ribeiro, Juliana Carvalho

Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) *in vivo*. Ribeirão Preto, 2010.

104p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Bianchi, Maria de Lourdes Pires.

1. Polpa de açaí. 2. *Euterpe oleracea* Mart. 3. Óleo de buriti. 4. *Mauritia flexuosa*. 5. Teste do micronúcleo. 6. Ensaio do cometa.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Juliana Carvalho Ribeiro

Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) *in vivo*.

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. Maria de Lourdes
Pires Bianchi

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

Ofereço essa obra para meu AMOR MAIOR,
meus filhotes Alice e Rafael e meus pais Izabel e Guy,

**“... Eu posso voar bem mais alto do que uma águia
porque vocês são como o vento sob as minhas asas...”**

(Lou Rawls- Wind beneath my wings)

Agradecimentos

Agradeço...

À Deus...

À Prof^a. Dr^a. Maria de Lourdes Pires Bianchi, minha orientadora. Agradeço pela oportunidade de ter sido sua orientada e por toda estrutura disponibilizada nos Laboratórios de Nutrigenômica e Bromatologia e Nutrição. A Dila é uma mulher que admiro muito e é uma das “Marias” que passou pela minha vida, me despertando aquele desejo infantil de “quero ser como você quando eu crescer”. Além dos valores técnicos, com ela eu aprendi que o bom humor e incentivo são fatores importantíssimos em qualquer situação, e que a vida é assim, um eterno aprender e reaprender...

À Prof^a. Dr^a. Lusânia Maria Greggi Antunes, coordenadora dos Laboratórios de Bromatologia e Nutrição e Nutrigenômica na FCFRP. Agradeço pelo envolvimento com a minha pesquisa, pela colaboração desde o início do projeto até a última proforma do manuscrito, mesmo não sendo minha orientadora. Obrigado pela paciência, pelo carinho e pelos muitos ensinamentos que me fizeram crescer profissionalmente e pessoalmente. É com muito carinho que me lembrarei de mais essa “Maria” que me ensinou a trabalhar com compromisso e dedicação.

À Prof^a. Dr^a. Adriana Zerlotti Mercadante (Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade de Campinas - FEA-UNICAMP), autora do projeto temático no qual este projeto de pesquisa foi inserido e coordenadora das análises relacionadas à identificação dos pigmentos.

À Veridiana Vera De Rosso e Adélia Ferreira de Faria, orientadas da Prof^a. Adriana, minhas parceiras que realizaram a parte experimental da identificação dos constituintes da polpa de açaí e do óleo de buriti.

Às indústrias brasileiras que com toda disponibilidade e boa vontade doaram seus produtos para as análises, não medindo esforços para que estes chegassem até as minhas mãos sem nenhum custo: Ricaeli Indústria de Polpa (polpa de açaí), Da Lamarta & Cia Ltda (óleo de buriti), Laboratório Bérghamo Ltda (doxorrubicina).

À técnica do laboratório Joana D'arc Castania Darin, que me auxiliou na parte experimental. Nossa afinidade e harmonia durante nossos trabalhos foram fundamentais. Agradeço pela boa vontade, amizade e ensinamentos.

À amiga Cátia Lira do Amaral, com quem sempre pude contar, desde os primeiros dias no laboratório. A Cátia nasceu com o dom de ensinar, com muita paciência, seriedade e boa vontade, me auxiliou na bancada, nos relatórios, na interpretação dos resultados, nas discussões e também compartilhamos boas risadas. Obrigado, amiga...

Aos meus parceiros de bancada Alexandre Ferro Aissa e Lívia Cristina Hernandez, inseridos também no mesmo projeto temático e que me auxiliaram durante toda a parte experimental e análises dos resultados.

Aos meus amigos de Pós-Graduação, minha equipe técnica, companheiros dentro do laboratório e também nas baladas de Ribeirão Preto: Alexandre Ferro Aissa, Cátia Lira do Amaral, Carla Machado, Eliziani Mieko Konta, Estela Beatriz Behling, Graciela

Cristina dos Santos, Juliana Mara Serpeloni, Leonardo Meneghin Mendonça, Livia Cristina Hernandez, Mara Ribeiro de Almeida, Patrícia Furlan, Rafaela Barros de Lima Bueno, Rita de Cássia Oliveira e Tarsila Úrsula Hermógenes Gomes.

Aos funcionários dos Laboratórios de Bromatologia e Nutrição e Nutrigenômica Regislaine e Daniel, agradeço pela disponibilidade e pela boa vontade na parte experimental e nos pequenos detalhes nos trabalhos do dia a dia.

Aos funcionários dos Biotérios, da Secretaria de Pós-Graduação e demais funcionários da FCFRP e do Campus Administrativo da USP de Ribeirão Preto, que, direta ou indiretamente, trabalham fornecendo condições para a realização da parte experimental e também deste curso de Pós-Graduação.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico (CNPq), que me forneceu a bolsa de estudos durante este período; FAPESP e CAPES pela concessão de auxílio financeiro para a realização do projeto de pesquisa.

Aos professores que passaram pela minha vida estudantil e acadêmica, os responsáveis por me mostrar um universo de descobertas. Alguns deles foram além do proposto nas ementas, conquistaram minha admiração, meu respeito e, em momentos diferentes da minha vida, me despertaram desejo de ensinar, buscar explicações ou me mostraram que a ciência é infinita... e isso é fascinante... Alguns nomes serão sempre inesquecíveis: D. Carlota Rios Damitto, quem me ensinou o abecedário; Prof. Jorge Farah, que hoje eu agradeço por ter sido tão exigente ao me ensinar seu inglês eterno; Prof^a. Ms. Marilda Rabelo Ribeiro do Valle, quem carinhosamente me apresentou a Biologia e, em outra oportunidade, a arte de ensinar; Prof^a. Dr^a. Maria Elisa Pereira Bastos de Siqueira, quem me iniciou na Toxicologia. Eu gostaria de citar todos os professores que não foram esquecidos, porém, me restringindo a alguns nomes específicos das áreas de Farmácia e Toxicologia, representando todos que contribuíram muito para “encher minha bagagem”: Prof^a. Dr^a. Maria Esperança Rabelo Junqueira, Prof. Dr. João Evangelista Fiorini, Prof^a. Dr^a. Ana Maria Duarte Costa, Prof. Dr. Fernando Barbosa Júnior, Prof. Dr. Bruno Spinosa De Martinis, e Prof^a. Dr^a. Danielle Palma de Oliveira.

À minha querida mãe, Izabel, meu apoio incondicional. Presente em todos os momentos, sempre acreditou no meu potencial, me ajudou em todos os sentidos ao longo deste período e me fez mais forte, mais lutadora e mais determinada.

À minha prima Prof^a. Dr^a. Flávia Cecílio Ribeiro, que, por ter trilhado este caminho antes, sempre foi minha grande incentivadora.

À minha família, que é meu alicerce concreto. Minha vovó Maria, meus irmãos Silvia Maria, Guy e Alexandre, todos os que já se foram, começando pelo meu pai Guy, os mais próximos ou os mais distantes, não citarei nomes porque são muitos e eu não posso cometer o erro de me esquecer de alguém... Mas agradeço por ter um porto-seguro e por poder contar com vocês para recarregar minhas energias...

**De coração, vocês foram importantíssimos ao longo desta caminhada.
Muito obrigado!**

**“... Quem sabe isso quer dizer amor,
estrada de fazer um sonho acontecer...”**

(LÔ BORGES)

RESUMO

RIBEIRO, J. C. **Avaliação do potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) in vivo.** 2010. 104f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os corantes são amplamente usados como aditivos na indústria alimentícia. Atualmente, diversas pesquisas têm demonstrado que alguns corantes de origem natural, como por exemplo, polifenóis, antocianinas, carotenóides, dentre outros, são dotados de efeitos benéficos, atuando como promotores da saúde, o que desperta o interesse na produção de alimentos com propriedades funcionais. A polpa de açaí é rica em pigmentos polifenóis e antocianinas, e o óleo de buriti é a maior fonte de β -caroteno já identificada em frutos até o momento. No entanto, ainda existem poucos estudos evidenciando os seus efeitos bioativos. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí e do óleo de buriti, frente aos danos ao DNA induzidos pelo antitumoral doxorrubicina (DXR), em diferentes tecidos de camundongos Swiss. As metodologias envolvem o teste do micronúcleo em células da medula óssea e em sangue periférico e o ensaio do cometa em células sanguíneas, renais e hepáticas em dois diferentes protocolos de tratamento, sendo um agudo (gavagem e eutanásia após 24 horas) e um sub-agudo (gavagem por 14 dias e eutanásia 24 horas após a última gavagem). Em cada protocolo de tratamento, foram testadas 3 doses diferentes da polpa de açaí (3,33; 10,00 e 16,67g/kg p.c.), usando 8 grupos experimentais (n=6). Seguindo o mesmo delineamento experimental, para cada protocolo de tratamento foram testadas 3 doses do óleo de buriti (100; 200 e 300 mg/Kg p.c.), diluído em óleo de milho, em 10 grupos experimentais (n=6). A DXR (16 mg/kg p.c.; i.p.) foi usada como controle positivo nos testes de antimutagenicidade. Nos ensaios com a polpa de açaí e com o óleo de buriti, em ambos os tratamentos, não houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os grupos tratados apenas com a polpa e o controle negativo, demonstrando ausência de efeitos genotóxicos e mutagênicos. Os tratamentos com as associações de polpa de açaí e DXR mostraram redução significativa ($p < 0,05$) de danos ao DNA induzidos pela DXR em todos os órgãos testados, no teste do micronúcleo e no ensaio do cometa, e o tratamento sub-agudo demonstrou ter sido mais efetivo na inibição da genotoxicidade induzida pela DXR. O óleo de buriti mostrou atividade antimutagênica significativa ($p < 0,05$) em células sanguíneas, no tratamento agudo e no tratamento sub-agudo. No entanto, nota-se que o óleo de milho, usado como solvente nos experimentos com o óleo de buriti interferiu nos resultados encontrados. A identificação e caracterização de pigmentos naturais polifenóis e antocianinas na polpa de açaí e carotenóides, tocoferóis e compostos fenólicos no óleo de buriti, mencionados na literatura como antimutagênicos e antigenotóxicos, pode justificar os resultados encontrados. Os efeitos antimutagênicos detectados na polpa de açaí e no óleo de buriti encorajam novos estudos, visto que estes podem ter seu uso amplamente explorado na indústria cosmética e farmacêutica, em ações de benefícios à saúde da população e, também na indústria alimentícia, no desenvolvimento de produtos com propriedades funcionais.

Palavras chaves: polpa de açaí, *Euterpe oleracea* Mart, óleo de buriti, *Mauritia flexuosa*, teste do micronúcleo, ensaio do cometa.

ABSTRACT

RIBEIRO, J. C. **Evaluation of the mutagenic and antimutagenic potential of açai pulp (*Euterpe oleracea* Mart) and buriti oil (*Mauritia flexuosa*) in vivo.** 2010. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

The dyes are widely used as additives in the food industry. Currently, several studies have shown that some dyes from natural sources, such as polyphenols, anthocyanins, carotenoids, among others, are endowed with beneficial effects, acting as health promoters, which raises the interest in the production of foods with functional properties. The açai is rich in polyphenols and anthocyanins pigments, and the buriti oil is the largest source of β -carotene in fruit that has been identified so far. However, there are few studies showing the bioactive effects. The aim of this study was to evaluate the mutagenic and antimutagenic proprieties of the açai pulp and buriti oil, compared to DNA damage induced by the antitumoral doxorubicin (DXR) in different tissues of Swiss mice. The methods involve the micronucleus test in bone marrow and peripheral blood and the comet assay in blood cells, liver and kidney in two different treatment protocols, an acute (gavage and euthanized after 24 hours) and a sub-acute treatment (gavage for 14 days and euthanized 24 hours after the last gavage). In each treatment protocol, we tested three different doses of açai pulp (3.33, 10.00 and 16.67 g/kg b.w.), using eight experimental groups (n=6). Following the same experimental design for each protocol were tested three doses trataments of buriti oil (100, 200 and 300 mg/kg b.w.), diluted in corn oil, in 10 experimental groups (n = 6). The DXR (16 mg/kg b.w., ip) was used as positive control in the antimutagenicity tests. In tests with the pulp and buriti oil in both treatments, there was no statistically significant difference ($p<0.05$) between groups treated with pulp and negative control, demonstrating a lack of genotoxic and mutagenic . The treatments with associations of açai pulp and DXR showed a significant reduction ($p<0.05$) in the DNA damages induced by DXR in all organs tested, in the micronucleus test and comet assay, and subacute treatment showed have been more effective in inhibiting the genotoxicity induced by DXR. Buriti oil showed antimutagenic activity ($p<0.05$) in blood cells, to treat acute and subacute treatment. However, note that the corn oil used as solvent in experiments with buriti oil results interfere in matches. The identification and characterization of natural pigments, polyphenols and anthocyanins in the açai pulp and carotenoids, tocopherols and phenolic compounds in the buriti oil, mentioned in the literature as antimutagenic and antigenotoxicity, can justify the results. The antimutagenic effects found in açai pulp and buriti oil encourage further studies, since they may have fully explored its use in cosmetic and pharmaceutical industry, in shares of health benefits to the population and also in the food industry in developing of products with functional properties.

Key words: açai pulp, *Euterpe oleracea* Mart, buriti oil, *Mauritia flexuosa*, micronucleus test, comet assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Cromatogramas da polpa de açaí obtidos por HPLC-PDA-MS/MS	34
Figura 2.	Gráfico da frequência de PCE/NCE em células de medula óssea de camundongos que receberam o tratamento agudo (24 horas) e sub-agudo (14 dias) de diferentes doses da polpa de açaí (gavagem) seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip)	38
Figura 3.	Cromatogramas do óleo de buriti obtidos por HPLC- DAD	42
Figura 4.	Gráfico da frequência de PCE/NCE em células de medula óssea de camundongos que receberam o tratamento agudo (24 horas) e sub-agudo (14 dias) de diferentes doses de óleo de buriti (gavagem) seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip)	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Tratamentos e grupos experimentais	26
Tabela 2 -	Composição fitoquímica da polpa de açaí	37
Tabela 3 -	Frequência de MN em eritrócitos de medula óssea e sangue periférico de camundongos <i>Swiss albinus</i> tratados com diferentes doses da polpa de açaí isoladamente ou associado com o antitumoral doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c., i.p.), nos tratamentos agudo (única gavagem, 24 horas) e sub-agudo (gavagem por 14 dias)	40
Tabela 4 -	Frequência de células com cometas, distribuição das classes de cometa, e índice de dano de DNA em sangue periférico, rins e fígado de camundongos tratados com diferentes doses da polpa de açaí (g/Kg p.c.) no tratamento agudo (gavagem única) seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia.....	40
Tabela 5 -	Frequência de células com cometas, distribuição das classes de cometa, e índice de dano de DNA em sangue periférico, rins e fígado de camundongos tratados com diferentes doses da polpa de açaí (g/Kg p.c.) no tratamento sub-agudo (gavagem por 14 dias) seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia.....	41
Tabela 6 -	Composição fitoquímica do óleo de buriti.....	43
Tabela 7 -	Frequência de MN em eritrócitos de medula óssea e sangue periférico de camundongos <i>Swiss albinus</i> tratados com diferentes doses do óleo de buriti isoladamente ou associado com o antitumoral doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c., i.p.), nos tratamentos agudo (única gavagem, 24 horas) e sub-agudo (gavagem por 14 dias).....	45
Tabela 8 -	% de DNA na cauda de células de sangue periférico, rins e fígado de camundongos tratados com diferentes doses de óleo de buriti (100; 200 e 300 mg/Kg p.c.) no tratamento agudo (gavagem única), seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia, pelo ensaio do cometa.....	48

Tabela 9 - % de DNA na cauda de células de sangue periférico, rins e fígado de camundongos tratados com diferentes doses de óleo de buriti (100; 200 e 300 mg/Kg p.c.) no tratamento sub-agudo (gavagem por 14 dias) seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia, pelo ensaio do cometa.....

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% DNA	Porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CE	Catequina
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DP	Desvio padrão
DXR	Doxorrubicina
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
FAPESP	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
GAE	Ácido gálico
HCl	Ácido Clorídrico
HPLC-PDA	High Performance Liquid Chromatography- Photo diode Array
HPLC-DAP	High Performance Liquid Chromatography- Diode array
ID	Índice de danos ao DNA
i.p	Intraperitoneal
KOH	Hidróxido de potássio
mA	Mili amperes
Min	Minutos
MN	Micronúcleo
MNPCEs	Micronúcleos em eritrócitos policromáticos
Na Cl 0,9%	Solução de cloreto de sódio a 0,9%(p/v)
NCE	Eritrócitos normocromáticos
N	Número amostral
p.c.	Peso corpóreo
pH	Potencial hidrogeniônico
RPM	Rotações por minuto
UI	Unidade internacional

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Marca registrada
%	Porcentagem
nm	Nanômetros
Kg	Quilograma
mg	Miligrama
mL	Mililitro
μL	Microlitro
M	Molar
μM	Micromolar
α	Alfa
β	Beta
°C	grau Celsius
n°	Número
>	Maior
T	Temperatura
v/v	volume por volume
V	Volts

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	iv
Lista de abreviaturas e siglas	vi
Lista de símbolos	vii
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O interesse no uso de corantes naturais pela indústria de alimentos	2
1.2. A biodiversidade amazônica como fontes alternativas.....	4
1.2.1. O açaí.....	6
1.2.2. O óleo de buriti.....	8
1.3. Efeitos antioxidantes e antimutagênicos.....	10
1.4. Ensaio de mutagenicidade.....	14
1.5.1. Teste do micronúcleo.....	15
1.5.2. Ensaio do cometa.....	16
2. OBJETIVO.....	19
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	21
3.1. Material.....	22
3.1.1. Agentes químicos.....	22
3.1.2. Caracterização fitoquímica da polpa de açaí e do óleo de buriti por HPLC.....	22
3.1.3. Animais utilizados no estudo.....	23
3.1.4. Delineamento experimental.....	24
3.2. Métodos.....	27
3.2.1. Teste do micronúcleo.....	27
3.2.2. Ensaio do cometa.....	29
3.3. Análise estatística.....	32
4. RESULTADOS.....	34
4.1. Polpa de açaí.....	34
4.1.1. Polpa de açaí: caracterização fitoquímica.....	34
4.1.2. Polpa de açaí: teste do micronúcleo.....	35
4.1.3. Polpa de açaí: ensaio do cometa.....	38
4.2. Óleo de buriti.....	42
4.2.1. Óleo de buriti: caracterização fitoquímica.....	42
4.2.2. Óleo de buriti: teste do micronúcleo.....	43
4.2.3. Óleo de buriti: ensaio do cometa.....	46
5. DISCUSSÃO.....	50
5.1. Polpa de açaí.....	58
5.2. Óleo de buriti.....	65
6. CONCLUSÃO.....	73
7. REFERÊNCIAS.....	75
8. ANEXOS.....	94

1. INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. O INTERESSE NO USO DE CORANTES NATURAIS PELA INDÚSTRIA DE ALIMENTOS

Nas últimas décadas, o uso de pigmentos ou corantes como aditivos tem sido amplamente explorado pela indústria alimentícia. Podendo ser de origem natural ou artificial, estes são utilizados na produção de alimentos e bebidas no intuito de compensar a perda da cor durante a fabricação e estocagem, garantir a uniformidade da cor e também de atribuir coloração àqueles originalmente incolores (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001). Assim, estes produtos se tornam mais atrativos aos olhos dos consumidores, considerando que a cor influencia na percepção do sabor, odor e pode estar associada à qualidade de um determinado produto.

Atualmente observa-se um crescimento no interesse do uso de corantes de origem natural em substituição aos corantes artificiais na síntese de alimentos processados, pois diversas pesquisas têm comprovado que os corantes artificiais oferecem riscos à saúde quando usados por longo prazo. Há relatos de reações alérgicas, comportamento hiperativo e depressivo, e, inclusive, alguns como os corantes com grupo azo, são dotados de atividade mutagênica (ABRANTES et al., 2007). Em função do risco de exposição, muitos países têm regulamentações próprias para o uso de corantes artificiais em alimentos industrializados (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; MAPARI; MEYER; THRANI, 2009). Existem listas específicas dos corantes alimentares que podem ser utilizados, proibindo algumas substâncias e estabelecendo os limites máximos diários permitidos para outras, com menor potencial

toxicológico (ABRANTES, et al., 2007). Porém, há uma variação de um país para outro, de acordo com cada agência regulatória. Atualmente, observa-se que alguns corantes artificiais são proibidos em alguns países e continuam sendo usados em outros. Corantes como o amaranto, amarelo laranja e ponceau 3 R, por exemplo, são corantes proibidos nos Estados Unidos, mas continuam sendo utilizados na indústria alimentícia em outros países, sendo o amaranto permitido em bebidas não alcoólicas no Brasil (ABRANTES et al., 2007).

Porém, há uma errônea concepção de que substâncias de origem natural são desprovidas de efeitos tóxicos e adversos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; WHO, 2004; SERPELONI et al., 2010). Alguns corantes naturais possuem atividade mutagênica e/ou carcinogênica, embora em menor frequência quando comparada aos corantes sintéticos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; ABRANTES, 2007).

Baseando-se em estudos capazes de identificar as potencialidades mutagênicas, teratogênicas ou carcinogênicas, as agências regulatórias estabelecem normas para o uso de substâncias, visando segurança aos usuários, normatizando parâmetros como limites máximos permitidos (LMP) e ingestão diária aceitável (IDA) para cada substância. No Brasil, a regulamentação do uso de aditivos para alimentos, inclusive dos corantes, é feita pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), agência regulatória veiculada ao Ministério da Saúde. Recentemente, foi publicada a Resolução RDC 41/2009, restringindo o uso de corantes e aromas em bebidas alcoólicas (ANTUNES; ARAÚJO, 2000; ABRANTES et al., 2007; BRASIL, 2009).

Alguns corantes naturais como curcumina, bixina, norbixina, clorofila, betaína, luteína, dentre outros, são dotados de efeitos bioativos benéficos, podendo ser considerados promotores da saúde humana, o que desperta o interesse na produção de alimentos com propriedades funcionais (KONG et al.,2003). Estudos epidemiológicos e experimentais têm demonstrado que existe uma relação inversa entre o consumo de uma dieta rica em legumes, frutos e grãos e o risco relativo de se desenvolver doenças crônico-degenerativas, tais como doenças cardíacas, câncer, obesidade e diabetes, sendo os pigmentos naturais um dos grupos bioativos responsáveis por estes efeitos benéficos (LILA, 2004). Assim, conhecer o potencial mutagênico/genotóxico de corantes naturais é uma informação essencial para as agências regulatórias, no que se refere ao delineamento de riscos que comprometam a saúde humana e também pode ser um indicativo na prevenção do câncer.

1.2. A BIODIVERSIDADE AMAZÔNICA COMO FONTE DE PESQUISAS

A bacia Amazônica representa uma riqueza considerável em termos de recursos genéticos em plantas frutíferas e oleaginosas, cuja valorização constitui uma perspectiva importante para essa região (OLSON, 1994; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^a). Plantas, ervas, sementes, frutos e outras matérias primas da vasta flora Amazônica já eram consumidos desde os primórdios povos indígenas que habitam esta região, e ainda hoje é uma prática constante e fundamental para a sobrevivência da população local. A prática de extrair da floresta remédios, alimentos e, até mesmo, produtos de beleza, presentes nos padrões culturais desta população, despertam

atualmente um interesse crescente nas indústrias farmacêutica, alimentícia, cosmética, entre outras, em nível nacional e internacional, considerando que os produtos provenientes da floresta vendem uma imagem ecologicamente correta e são fontes inesgotáveis de pesquisas em função da enorme biodiversidade oferecida. Na exploração da biodiversidade Amazônica de modo sustentável, a comercialização de óleos e sementes é uma alternativa viável que têm demonstrado grande importância econômica no desenvolvimento desta região. Espécies nativas como castanha do Brasil (*Bertholletia excelsa*), andiroba (*Carapa guianensis*), babaçu (*Orbignya* spp.), cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*), murumuru (*Astrocaryum murumuru*), buriti (*Mauritia flexuosa*) e maracujá (*Passiflora* spp.), são exemplos de óleos vegetais que são amplamente comercializados (SARAIVA et al., 2009) e, em função deste interesse, também têm sido alvo de estudos científicos, sendo muito importante a investigação de suas propriedades químicas, físicas e bioativas (ALBUQUERQUE et al., 2005).

As palmeiras constituem um dos grupos de plantas mais importantes para a região Amazônica por estarem diretamente relacionadas à subsistência do homem desta região (PASSOS; MENDONÇA, 2006). Seus frutos são considerados muito promissores por serem fontes alternativas e abundantes de óleos vegetais com altos valores nutricionais (FRANÇA et al., 1999). Dentre os diversos frutos amazônicos, sabe-se que o açaí (*Euterpe oleracea* Mart) é um fruto rico em pigmentos polifenóis e antocianinas e o buriti (*Mauritia flexuosa*) é rico em carotenóides. A análise de suas propriedades bioativas em testes *in vivo* é fundamental para direcionar outras pesquisas, pois podem ser alternativas promissoras para o seu uso na indústria alimentícia e farmacêutica

e também em ações voltadas para a promoção à saúde da população.

1.2.1. O AÇAÍ

O açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) é uma palmeira Amazônica da família Palmaceae, também conhecido como assai, jacara, juçara, palmitero, piril, manaka e prasara (PLOTKIN; BALICK, 1984). É amplamente distribuído pela região Norte da América do Sul, especialmente nos estados do Pará, Amazonas, Tocantins, Maranhão e Amapá (ROCHA et al., 2007). Os frutos são arredondados, têm a cor arroxeada, quase negra quando maduros, medindo de 1 a 1,4 cm de diâmetro e mesocarpo com cerca de 1 mm de espessura (TOAIARI et al., 2005). Os açaís aparecem em cachos e são colhidos, principalmente, entre os meses de julho a dezembro (ROGEZ, 2000; PACHECO-PALENCIA et al., 2007).

O açaí é um fruto que representa a força da cultura popular e indígena da região Norte do Brasil (MURRIETA; DUFOUR; SIQUEIRA, 1999). Herança dos índios que habitavam as terras hoje ocupadas pela cidade de Belém, a lenda do açaí remete a uma época em que havia grande escassez de alimento, obrigando o cacique da tribo a mandar sacrificar todos os recém-nascidos. A primeira vítima foi justamente o bebê de sua filha laçá. Numa noite, inconsolável, laçá ouviu um choro de criança vindo do alto de uma palmeira, no mesmo lugar onde sua menina havia sido enterrada. A jovem mãe morreu abraçada à palmeira, com a cabeça erguida em direção ao topo da árvore e um sorriso sereno no rosto. O cacique ordenou que trouxessem para baixo os cachos daqueles frutinhas pretos e redondos. Então, mandou amassá-los e com o sumo alimentou a tribo. Daquele dia em diante, não precisariam imolar

mais qualquer criança. Em homenagem à filha, o pai de laçá deu ao fruto o nome de açáí (AMAZONVIEW, 2009).

A polpa do açáí é consumida *in natura*, em forma de suco, sorvete, geléia, mingau e também na forma fermentada, originando o vinho do açáí que é um ícone da culinária paraense. A maioria da população Amazônica consome a polpa de açáí na sua dieta diária (TINOCO, 2005). Em um estudo recente, por meio de uma anamnese alimentar de uma determinada população Amazônica, calculou-se que a média de consumo de açáí ingerida por pessoa é cerca de 500 mL por dia (KHAYAT, 2005) e, relata-se ainda que, em algumas áreas, o consumo individual pode chegar a 2 litros por dia. Atualmente, o consumo de açáí ultrapassou as fronteiras da região produtora e seu uso se popularizou em todo o Brasil na forma da conhecida “tigela de açáí”, muito consumida por atletas. É considerado um alimento energético contendo altos índices de proteínas, lipídios, carboidratos, cálcio, fósforo, ferro e tiamina, fornecendo alto valor calórico (CÓRDOVA-FRAGA et al., 2004). Desperta interesse por ser um fruto diferente, com sabor exótico e também devido aos potenciais benefícios à saúde, associados a sua composição fitoquímica (PACHECO-PALENCIA et al., 2007).

De acordo com a medicina popular, o açáí é usado como hemostático em casos de lesões na pele (PLOTKIN; BALICK, 1984), como suplemento alimentar no combate a anemia (TOAIARI et al., 2005) e o óleo obtido da polpa é usado como anti-diarréico, sem, contudo, haver qualquer comprovação científica até o momento respaldando tais efeitos. No entanto, alguns estudos demonstraram alta capacidade antioxidante, principalmente em função da presença de antocianinas (COISSON et al., 2005; PACHECO-PALENCIA et al.,

2007). A coloração púrpura a negra do açaí ocorre em função da alta concentração de pigmentos naturais antocianinas e outros polifenóis, o que desperta o interesse de pesquisas que buscam suas propriedades bioativas e alternativas naturais para substituir o uso de corantes artificiais. Recentemente, o açaí foi reconhecido como uma alternativa ao agente de contraste oral em ressonância magnética do sistema gastrointestinal (CÓRDOVA-FRAGA et al., 2004) e também como uma alternativa viável em odontologia, como substância evidenciadora do biofilme dental (TUPINAMBÁ, 2006).

Alguns estudos na área de cardiologia comprovaram que os pigmentos polifenóis, presentes em altas concentrações no açaí, são responsáveis por efeitos benéficos, diminuindo o risco de desenvolvimento de doenças coronarianas. Seu consumo na dieta, hábito diário da população de Inhangapí, no estado do Pará, demonstrou ser um fator coadjuvante na diminuição do risco para o desenvolvimento de doença aterosclerótica coronária (KHAYAT; COSTA, 2006). Em outro estudo, os polifenóis contidos no açaí foram responsáveis por um potente efeito vasodilatador, indicado no tratamento de doenças cardiovasculares (ROCHA et al., 2007). O estudo da função antioxidante tem despertado interesse no seu possível papel como alimento funcional e na Itália, já foi desenvolvido um iogurte usando a polpa de açaí como pigmento, oferecendo um produto final com propriedades funcionais (COISSON et al., 2005).

1.2.2. O ÓLEO DE BURITI

Entre as palmeiras amplamente distribuídas pela região Amazônica, o buriti (*Mauritia flexuosa* L. f.), tem seu uso difundido entre a população local. É

uma palmeira da família Arecaceae (FRANÇA, 1998), restrita à América do Sul e bem distribuída por toda a região Amazônica e região central do Brasil. Buriti é um nome derivado do tupi-guarani e significa “o que contém água”. Nas regiões onde se encontra, o buriti é a planta mais importante, do qual o homem local aprendeu a retirar parte essencial do seu sustento. Por isso é considerada pelos nativos como a “árvore da vida”, pois dela tudo se aproveita (PLOTKIN; BALICK, 1984). É amplamente utilizado por comunidades indígenas e extrativistas representando grande potencial econômico. O buriti é encontrado no seu estado silvestre em várias formações vegetais, principalmente em áreas de inundação permanente ou periódica, em grupos homogêneos, aos quais se dá o nome de miritizais ou buritizais.

Conhecido também como muriti, o fruto castanho-avermelhado tem superfície revestida por escamas brilhantes e polpa amarela forte e pode ser facilmente encontrado nas feiras das cidades da região Norte do Brasil, no período de dezembro a julho. É amplamente consumido pela população local como alimento *in natura* ou na forma de sub-produtos como bebida fermentada, doce, farinha e óleo. Extraído artesanalmente pela prensagem da polpa e semente, o óleo de buriti é comestível, empregado principalmente na fritura de peixes. Seu uso medicinal é amplamente difundido pela sabedoria popular, usado como vermífugo, laxante e digestivo (PLOTKIN; BALICK, 1984), porém ainda sem comprovações científicas. Sendo capaz de absorver radiações no espectro ultra-violeta é um eficiente filtro solar (ALBUQUERQUE et al., 2005), há muito tempo utilizado pelos pescadores das comunidades ribeirinhas como tal. Além de ser um potente energético, rico em pró-vitamina A (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^a), o óleo de buriti é usado pela população local em

aplicações tópicas em caso de queimadura da pele, provocando alívio imediato e auxiliando no processo de cicatrização. Recentemente, foi descoberto pela indústria cosmética como filtro solar e como antioxidante e, também por possuir composição graxa emoliente, vem sendo amplamente usado para estes fins, constituindo formulações como sabonetes, cremes, loções e xampus (ZANATTA et al., 2010).

Pesquisas relacionadas à caracterização de sua composição fitoquímica demonstraram que o buriti é uma importante fonte de β -caroteno, α -tocoferol e ácido oléico (GARCIA-QUEIROZ, 2003; COSTA, 2007; ZANATTA et al., 2010). A identificação e caracterização por HPLC-PDA-MS/MS, resultou em 514 $\mu\text{g/g}$ de β -caroteno, valor muito superior a outros frutos como mamão (*Mammea americana*), marimari (*Geoffroia striata*), pêssego (*Bactrys gasipaes*), camapu (*Physalis angulata*) e tucumã (*Astrocaryum aculeatum*) (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^a). O óleo de buriti apresentou altíssimo teor de β -caroteno, equivalente a 90% do total de carotenóides contidos, fazendo deste fruto a maior fonte já estudada deste pigmento. Em função desta composição, o buriti demonstra ser um fruto de grande interesse, podendo apresentar ação antioxidante e outros efeitos bioativos que ainda não foram investigados.

1.3. EFEITOS ANTIOXIDANTES E ANTIMUTAGÊNICOS

Diversas pesquisas têm evidenciado a caracterização e identificação de efeitos bioativos em frutos Amazônicos. Muitos frutos exóticos e plantas medicinais encontrados na região Amazônica, comuns na dieta da população local, são dotados de atividade antioxidante em estudos *in vitro* (ZANATTA et al., 2008; JESUS et al., 2008). Entre os frutos e oleaginosas provenientes do

extrativismo, muitos apresentam composições notáveis em micronutrientes e especialmente em antioxidantes, como carotenóides, antocianinas e outros polifenóis (OSLON, 1994; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^a). A comprovação científica de tal atividade pode levar à identificação de novas fontes de antioxidantes, sendo um incentivo para a preservação dessas plantas nativas e contribuindo para o desenvolvimento sustentável da região (SILVA et al., 2007; SARAIVA et al., 2009).

Do ponto de vista biológico, os antioxidantes podem ser definidos como qualquer substância que, presente em baixas concentrações, quando comparado a um substrato oxidável, retarda ou inibe a oxidação desse substrato (SIES, 1995; AUST et al., 2001). Durante o metabolismo celular, ocorre a formação de radicais livres, ou seja, em um cenário de reação de oxirredução, são formadas moléculas orgânicas e inorgânicas e átomos altamente instáveis, com meia vida muito curta, que contêm um ou mais elétrons não pareados na última camada de valência, sendo quimicamente muito reativos (HALLIWELL, 1990). São exemplos de radicais livres: oxigênio singlete, radical superóxido, radical hidroxila, óxido nítrico, radical semiquinona, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito. A formação de radicais livres pode ocorrer no citoplasma, mitocôndrias, membrana plasmática, núcleo ou em alvos celulares como proteínas, lipídeos e carboidratos (ANDERSON, 1996; HALLIWELL, 2010).

Os radicais livres são estruturas químicas geradas no funcionamento normal de vários processos biológicos, tais como a fagocitose, metabolismo lipídico, respiração aeróbica e biotransformação de xenobióticos, regulação do crescimento celular, sinalização intercelular e síntese de substâncias

biológicas. No entanto, o excesso apresenta efeitos prejudiciais, tais como a peroxidação lipídica nas membranas e agressão às proteínas dos tecidos, às enzimas, carboidratos e DNA, sendo responsáveis pelo surgimento de efeitos deletérios, alterando atividades celulares e originando processos como o envelhecimento, depressão imune e doenças degenerativas crônicas, tais como o câncer e doenças cardiovasculares (ÁLVAREZ-GONZÁLEZ et al., 2004).

Nas últimas décadas, foram realizadas inúmeras pesquisas para esclarecer o papel dos radicais livres em processos fisiopatológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose e inflamação (ÁLVAREZ-GONZÁLEZ et al., 2004). Os organismos sofrem ação constante de radicais livres, gerados pelos processos inflamatórios, por disfunções biológicas ou provenientes dos alimentos (HALLIWELL, 1995). Portanto, o equilíbrio entre a formação e remoção de espécies radicalares no organismo deve ser regulado por processos metabólicos a fim de se manter a fisiologia celular. O conjunto das substâncias que neutralizam os efeitos danosos dos radicais livres constitui o sistema de defesa antioxidante. É essencial o equilíbrio entre agentes óxido-redutores e o sistema de defesa antioxidante (FERREIRA; MATSUBARA, 1997). Quando a produção de radicais livres é excessiva, ocorre o estresse oxidativo, ou seja, os antioxidantes naturais são insuficientes para combater o excesso de espécies radicalares geradas (ANDRADE JUNIOR et al., 2005). Fontes externas de exposição a poluentes como cigarros, ingestão de bebidas alcoólicas, raios solares, raios X, uso de medicamentos e ingestão excessiva de gorduras são exemplos de fatores que aumentam o estresse oxidativo (FERREIRA; MATSUBARA, 1997).

Apesar de ocorrer produção endógena de antioxidantes, recomenda-se a obtenção complementar destes na dieta, tais como as vitaminas C, E e A, os flavonóides e carotenóides que são extremamente importantes na interceptação dos radicais livres, diminuindo os danos originados pelos processos oxidativos nos organismos vivos (BIANCHI; ANTUNES, 1999; ROCHA-GUZMÁN et al., 2007).

O DNA é o principal componente celular susceptível ao ataque dos radicais livres (ARUOMA, 2003). Os danos no DNA causados pelas espécies radicalares geradas durante o metabolismo celular desempenham um papel importante nos processos de mutagênese e carcinogênese, além de outras doenças crônico-degenerativas (POULSEN et al., 1998, ALVAREZ-GONZÁLES et al., 2004, LEE; LEE, 2006). Na presença de agentes físicos, químicos e biológicos, podem ocorrer danos ao DNA que, se não forem reparados, podem causar mutações celulares em um organismo, denominado efeito mutagênico. Ao contrário, quando ocorre proteção aos danos ao DNA induzidos por algum agente mutagênico, ou seja, quando as mutações são impedidas, denomina-se efeito antimutagênico. Para avaliar este efeito são utilizados testes como o teste do micronúcleo, ensaio do cometa e aberrações cromossômicas (SINGH, 1988; HAYASHI; SOFUNI; MORITA, 1991).

Antimutagênese é o processo no qual ocorre inibição das taxas de mutação nos seres vivos, e conseqüentemente, diminui a incidência de câncer (WATERS et al., 1996). A partir da década de 1950, iniciaram-se os estudos com os agentes antimutagênicos e, atualmente, diversos grupos de pesquisa, distribuídos por todo o mundo, têm se concentrado na identificação de agentes antimutagênicos, principalmente os de origem natural (ANTUNES; ARAÚJO,

2000). Uma dieta rica em agentes antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos é uma estratégia extremamente importante na prevenção do câncer. Muitos compostos antimutagênicos encontrados nos alimentos são agentes antioxidantes e atuam seqüestrando os radicais livres de oxigênio, quando administrados como pré-tratamento ou nos tratamentos simultâneos com o agente que induz as mutações no DNA (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

Uma grande variedade de espécies vegetais que contém polifenóis e flavonóides têm sido relatada como agentes anticarcinogênicos e antimutagênicos devido às suas atividades antioxidantes (NANDAKUMAR et al., 2008).

1.4. ENSAIOS DE MUTAGENICIDADE

Em busca da proteção à saúde do usuário, antes de um composto entrar no mercado, é necessário que seja determinado o potencial mutagênico deste. As agências regulatórias exigem a realização de testes de mutagenicidade, seguindo protocolos com metodologias bem definidas e reconhecidas internacionalmente.

De acordo com a ANVISA, testes de genotoxicidade são testes *in vitro* e *in vivo*, específicos para detectar o potencial das substâncias sob investigação de causar mutações genéticas e cromossômicas. Pelas normas estabelecidas, além de testes *in vitro*, recomenda-se a realização de testes *in vivo* com dois tecidos, geralmente um teste de micronúcleo usando células hematopoiéticas de rato e um segundo ensaio de genotoxicidade *in vivo* (ANVISA, 2010). Nos Estados Unidos, a Agência de Proteção Ambiental, veiculada à agência regulatória “Food and Drugs Administration”, também

determina a realização de testes que evidenciem a descoberta de fatores envolvidos na etiologia do câncer (PRESTON, 2007). Dentre as metodologias recomendadas, cita-se o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa *in vivo*.

1.4.1. TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (HAYASHI et al., 1991; HAYASHI et al., 2007). Neste teste, a substância a ser avaliada é administrada em roedores e o efeito pode ser observado em esfregaços de células da medula óssea ou de sangue periférico.

Na medula óssea, durante o processo de divisão celular, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos, diferenciando-se em eritrócitos policromáticos. Estes são eritrócitos jovens, ricos em ribossomos e, por isso, são facilmente corados, diferenciando-se dos eritrócitos maduros ou normocromáticos que não contêm ribossomos. Na presença de agentes clastogênicos e/ou de agentes aneugênicos, os fragmentos cromossômicos resultantes de quebras do material genético ou de cromossomos inteiros que não se prenderam às fibras do fuso, podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose, originando o micronúcleo. Este, por sua vez, permanece no citoplasma e pode ser facilmente visualizado em eritrócitos policromáticos. Considerando que o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, qualquer micronúcleo que ele contenha tem grande probabilidade de ter sido gerado como danos cromossômicos induzidos recentemente, na presença de uma substância que causou este dano

(SCHIMID,1976). De acordo com o protocolo descrito por Hayashi (1992), o teste do micronúcleo também pode ser realizado em células sanguíneas de roedores tratados com agentes mutagênicos com resultados confiáveis.

O teste do micronúcleo é um teste amplamente utilizado para detectar danos cromossômicos. Comparando-se a outros ensaios citogenéticos como aberrações cromossômicas e troca de cromátides irmãs, é considerado mais simples tanto na execução quanto na análise microscópica e, ainda, mostra claramente o aumento nos danos ao DNA. Entretanto, quando se trata de exposição à níveis baixos de xenobióticos, raramente serão encontrados resultados positivos, devendo sempre ser confirmado com outros ensaios citogenéticos (AZEVEDO et al., 2006). Atualmente, alguns estudos avaliando o potencial mutagênico e antimutagênico de compostos têm sido relatados, utilizando o teste do micronúcleo em células de medula óssea e em células de sangue periférico de roedores (ÁLVAREZ-GONZÁLEZ et al., 2004; ACEVEDO et al., 2006; SANTOS et al., 2006; ZAMORANO-PONCE et al., 2006, AZEVEDO et al., 2006; REZENDE et al., 2007; FURTADO et al., 2008; PEREIRA et al.,2008; RIBEIRO et al., 2009; RODRIGUES et al., 2009; HOELZL et al., 2009; OLIVEIRA et al., 2009).

1.4.2. ENSAIO DO COMETA

Denominado “single cell gel electrophoresis test” (SCGE), a metodologia do ensaio do cometa foi descrita por Singh et al. (1988) e modificada por Speit e Hartman (1999). No protocolo descrito por Speit; Hartman (1999), para a realização deste ensaio, retira-se células sanguíneas de um animal tratado com a substância em análise e este sangue é misturado com agarose de baixo

ponto de fusão. Quando a agarose é solidificada, as células são lisadas em uma solução detergente, por pelo menos uma hora, e então as lâminas são colocadas em câmara de eletroforese com solução alcalina, permitindo o desenrolar do DNA. Quando o composto em análise provoca alguma modificação no material genético, este procedimento resulta na migração de pequenos fragmentos do DNA através do gel de agarose na eletroforese. Assim, caracterizam-se imagens de nucleóides como cometas, com cabeça e cauda, que, quando corados com solução de brometo de etídio, podem ser observados em microscópio de fluorescência. Os danos ao DNA podem ser verificados pelo escore visual ou por análise automatizada, através da análise de sistemas diretos de fotomicrografias por *software* específico. No escore visual, são classificados em quatro categorias, distribuídos desde a classe zero, em que as células não apresentam cauda (dano mínimo), até a classe quatro, em que as células apresentam o tamanho da cauda superior a duas vezes ou mais o tamanho da cabeça (dano máximo) (COLLINS et al., 1995). A mesma técnica pode ser usada substituindo o sangue por outros tecidos, a partir da obtenção de uma suspensão celular do órgão em análise (UENO et al., 2007).

O ensaio do cometa é descrito como um teste rápido, simples na execução, não requer grande quantidade de amostra da substância teste, pode ser aplicado em diferentes tecidos dos quais se obtêm suspensões de determinadas células, é acessível financeiramente além de ser considerado um ensaio de alta sensibilidade e especificidade (ROJAS et al., 1997). É uma técnica utilizada para detectar danos ao DNA em células individuais, podendo ser aplicado em sistemas *in vitro*, *in vivo* e *ex vivo* (CEMELI et al., 2008). O

ensaio do cometa permite a detecção de lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção pelo sistema de reparo (ROJAS et al., 1997).

Há muitos relatos na literatura utilizando o ensaio do cometa, evidenciando sua versatilidade e sensibilidade, sendo amplamente recomendado para avaliação de respostas celulares e para a detecção de danos ao DNA (MAISTRO et al., 2004; COLLINS et al., 2008; SMITH et al., 2008; CEMELI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009; HOELZL et al., 2009; KUSHWAHA et al., 2010). O ensaio do cometa é uma ferramenta confiável, que tem sido utilizada com sucesso para a investigação de compostos com atividade antioxidante. É uma técnica muito válida para verificar se as interações entre compostos antioxidantes e micronutrientes são capazes de proteger a integridade do material genético (CEMELI et al., 2008).

Até o momento, não há dados na literatura sobre os efeitos genotóxicos e mutagênicos da polpa de açaí e do óleo de buriti *in vivo*. Em função da sua composição fitoquímica, contendo altas quantidades de pigmentos naturais antioxidantes, é possível que estes frutos apresentem também efeitos bioativos, como, por exemplo, propriedades antimutagênicas. No entanto, ainda existem poucas pesquisas neste sentido. Assim, os experimentos deste trabalho verificaram as possíveis ações mutagênicas e genotóxicas da polpa de açaí e do óleo de buriti, e também suas possíveis atividades antígeno-tóxicas e antimutagênicas, frente aos danos ao DNA induzidos pelo antitumoral doxorrubicina, em células saudáveis de camundongos Swiss.

2. OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial mutagênico e antimutagênico da polpa de açaí (*Euterpe oleracea* Mart) e do óleo de buriti (*Mauritia flexuosa*) em células de medula óssea, sanguíneas, hepáticas e renais de camundongos tratados com o antitumoral doxorrubicina em dois protocolos de tratamento distintos, sendo um agudo e outro sub-agudo.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar os possíveis efeitos mutagênicos e genotóxicos de diferentes doses da polpa de açaí e do óleo de buriti em células de camundongos, usando o teste do micronúcleo em células sanguíneas e células de medula óssea, e o ensaio do cometa em células sanguíneas, hepáticas e renais;
- Verificar os possíveis efeitos antimutagênicos e antigenotóxicos de diferentes doses da polpa de açaí e óleo de buriti frente aos danos ao DNA induzidos pela DXR em células de roedores *in vivo*;
- Caracterização fitoquímica da polpa de açaí e do óleo de buriti por metodologias específicas.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

Este estudo é parte do projeto temático “Avaliação integrada da estabilidade e propriedades funcionais de pigmentos naturais de alimentos” financiado pela FAPESP (processo nº05/59552/6).

3.1. MATERIAL

3.1.1. AGENTES QUÍMICOS

A polpa de açaí avaliada neste estudo foi doada pela Indústria e Comércio de Frutas Ricaeli Ltda, Cabreúva- SP. As embalagens contendo 100 g da polpa de açaí foram recebidas do fabricante congeladas a temperatura de 20°C negativos, e assim mantidas até a véspera dos experimentos, quando foram descongeladas e administradas diretamente aos animais por gavagem (lote 012007).

O óleo de buriti foi doado pela indústria de extração de óleos vegetais Inovam do Brasil, Inovam - Da Lamarta & Cia Ltda, Ji-Paraná- RO. As embalagens contendo o óleo de buriti foram recebidas, mantidas e administradas em temperatura ambiente (lote A0109).

A doxorubicina (DXR, Rubidox®, lote 06/22546, CAS nº 25316-40-9) foi doada pelo Laboratório Químico Farmacêutico Bérigamo Ltda (Brasil). Para obter a dose final desejada, o pó foi dissolvido em água destilada imediatamente antes de cada administração, com a mínima luz indireta. Todos os outros reagentes utilizados foram da mais alta pureza.

3.1.2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DA POLPA DE AÇAÍ E DO ÓLEO DE BURITI POR HPLC

As caracterizações dos principais fitoquímicos presentes na polpa de açaí e no óleo de buriti foram realizadas no Departamento de Ciências dos Alimentos da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, com a colaboração da equipe da Prof^a. Dr^a. Adriana Zerlotti Mercadante. Na polpa de açaí, carotenóides, antocianinas, compostos fenólicos e flavonóides foram identificados e caracterizados de acordo com protocolo específico, em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) com bombas quarternárias, conectado a um detector de fotodiodo em série (PDA) e espectrômetro de massa com detector de “íon-trap” (MS/MS). No óleo de buriti, os pigmentos carotenóides, compostos fenólicos, tocoferóis e tocotrienóis foram identificados e caracterizados por cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC), usando um sistema de bombeamento isocrático e um detector de fluorescência (DAD). As metodologias empregadas em cada análise seguiram os protocolos descritos por De Rosso e Mercadante, (2007^a) e De Rosso e Mercadante (2007^b) e estão disponíveis no anexo 1.

3.1.3 ANIMAIS UTILIZADOS NO ESTUDO

Os animais usados neste estudo foram camundongos machos, da linhagem Swiss albino, saudáveis, com peso médio corporal $30 \pm 0,5$ g, com idade de 7-8 semanas, obtidos do Biotério Central da Coordenadoria do Campus Administrativo de Ribeirão Preto (Universidade de São Paulo, Brasil). O protocolo experimental para a realização deste estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética para Uso de Animais (CEUA) da USP de Ribeirão Preto, protocolo nº 06.1.909.53.7 (Anexo 2). Os procedimentos envolvendo os

animais e seus cuidados foram realizados de acordo com as leis nacionais e internacionais e com as orientações para a utilização de animais em pesquisas biomédicas.

Os animais foram mantidos em caixas de policarbonato em condições ambientais controladas: temperatura ($22 \pm 2^{\circ}\text{C}$), umidade ($55 \pm 10\%$) e ciclo alternado de claro/escuro de 12 horas. Ração padrão para roedores Nuvilab CR-1® da empresa Nuvital e água foram oferecidas *ad libitum*. Todos os ensaios foram conduzidos após um período de 48 horas para adaptação, e os animais permaneceram em caixas de contenção com, no máximo, 4 animais em cada caixa. Para os ensaios com a polpa de açaí, os animais foram divididos em 16 grupos de tratamento, sendo 6 animais em cada grupo e, para o óleo de burití, os animais foram divididos em 20 grupos experimentais, sendo 6 animais em cada grupo, de acordo com o esquema apresentado na Tabela 1. Foram usados os mesmos animais para análise de todos os parâmetros (teste do micronúcleo e ensaio do cometa).

3.1.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

As doses da polpa de açaí (3,33; 10,0 e 16,67 g/Kg p.c.) e do óleo de burití (100; 200 e 300 mg/Kg p.c.) foram selecionadas em ensaios preliminares. A Tabela 1 mostra os grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

Em ambos os casos, foram realizados dois protocolos experimentais distintos, sendo um tratamento agudo (única gavagem seguida de injeção intraperitoneal (i.p.) e eutanásia após 24 horas) e um tratamento sub-agudo (gavagem diária durante 14 dias, sendo a última gavagem seguida de i.p. e eutanásia após 24 horas).

De acordo com cada grupo experimental (Tabela 1), a injeção i.p. foi de doxorubicina (16 mg/Kg p.c.) ou solução salina. A dose de DXR (16 mg/Kg p.c.) foi selecionada baseando-se na sua eficácia de indução de danos cromossômicos em roedores (ANTUNES; TAKAHASHI, 1998; PRAHALATHAN et al., 2006). Os grupos controle negativo foram tratados de modo similar, recebendo água por gavagem e i.p. de solução salina 0,9%. Depois de 4 horas da aplicação intraperitoneal, coletou-se o sangue diretamente da veia caudal para a realização do ensaio do cometa. Passadas 24 horas após a aplicação i.p., os animais foram anestesiados com solução de hidratado de cloral 10% (4mL/100g p.c.), coletou-se o sangue da veia caudal para o teste do micronúcleo de cada animal e, logo em seguida, os camundongos foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical. Imediatamente após a eutanásia, retirou-se os fêmures, rins e fígado, desprezando os tecidos aderentes.

A fim de se administrar as doses preconizadas, o óleo de buriti foi diluído em óleo de milho (Salada®), cuja composição está descrita no anexo 2. Assim, para o controle do solvente, adicionou-se um grupo de tratamento administrando-se gavagem com óleo de milho e i.p. de solução salina 0,9% e outro administrando-se gavagem de óleo de milho e i.p. de DXR.

Tabela 1: Tratamentos e grupos experimentais

Tratamento	Grupos*	Doses
Polpa de Açaí		
Controle Negativo	1 e 9	Água (gavagem), solução salina (i.p.)
Polpa de Açaí	2 e 10	3,33 g/Kg p.c.(gavagem), solução salina (i.p.)
	3 e 11	10,0 g/Kg p.c. (gavagem), solução salina (i.p.)
	4 e 12	16,67 g/Kg p.c. (gavagem), solução salina (i.p.)
Controle Positivo (DXR)	5 e 13	Água (gavagem), DXR (i.p.)
Polpa de Açaí + DXR	6 e 14	3,33 g/Kg p.c.(gavagem), DXR (i.p.)
	7 e 15	10,0 g/Kg p.c (gavagem), DXR (i.p.)
	8 e 16	16,67 g/Kg p.c. (gavagem), DXR (i.p.)
Óleo de Buriti		
Controle Negativo	1 e 11	Água (gavagem), solução salina (i.p.)
Óleo de milho	2 e 12	Óleo de milho (gavagem), solução salina (i.p.)
Óleo de Buriti	3 e 13	100 mg/Kg p.c.(gavagem), solução salina (i.p.)
	4 e 14	200 mg/Kg p.c. (gavagem), solução salina (i.p.)
	5 e 15	300 mg/Kg p.c. (gavagem), solução salina (i.p.)
Controle Positivo (DXR)	6 e 16	Água (gavagem), DXR (i.p.)
Óleo de milho + DXR	7 e 17	Óleo de milho (gavagem), DXR (i.p.)
Óleo de Buriti + DXR	8 e 18	100 mg/Kg p.c. (gavagem), DXR (i.p.)
	9 e 19	200 mg/Kg p.c. (gavagem), DXR (i.p.)
	10 e 20	300 mg/Kg p.c. (gavagem), DXR (i.p.)

* 1-8 açaí e 1-10 óleo de buriti são grupos do tratamento agudo (24 h). 9-16 açaí e 11-20 óleo de buriti são grupos do tratamento sub-agudo (14 dias).
DXR= doxorubicina, 16 mg/Kg p.c.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. TESTE DO MICRONÚCLEO

O teste do micronúcleo em células de medula óssea e em sangue periférico da veia caudal foram realizados de acordo com os protocolos descritos por MacGregor et al. (1987) e Hayashi et al. (2000).

Os animais foram previamente anestesiados com solução de hidrato de cloral 10% na dose de 0,4mL/100g p.c. Primeiramente, coletou-se o sangue da veia caudal do animal para a realização do teste do micronúcleo em sangue periférico. Imediatamente, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical, quando os fêmures foram retirados, e as células da medula óssea foram coletadas.

No teste do micronúcleo em sangue periférico usaram-se colorações diferentes para a avaliação da polpa de açaí e para o óleo de buriti. Para a polpa de açaí, as lâminas com esfregaços sanguíneos foram submetidas à reação Feulgen, seguida da coloração com o corante Fast-Green® (Sigma-Aldrich Co.), de acordo com o protocolo citado por Bueno; Agostini, (2001). Na reação de Feulgen, os esfregaços de sangue previamente fixados e secos foram colocados em HCl 5 N, a temperatura ambiente, durante 20 minutos. Retirou-se do HCl 5 N e lavou-se em água corrente por 10 minutos e as lâminas secaram ao ar. Depois de secas, as preparações foram colocadas no reativo de Schiff por 90 minutos. Retirou-se do reativo de Schiff, lavou-se rapidamente, lâmina por lâmina, em água corrente, secando ao ar. Secas, as lâminas foram colocadas por 1 minuto em solução ácida de Fast-Green® (0,1 g de Fast-Green diluído em 100 mL de ácido acético 1%), em seguida lavadas em dois banhos de água destilada e secas em temperatura ambiente.

Imediatamente após a secagem, os micronúcleos foram analisados em 1.000 eritrócitos por lâmina no total de 2.000 eritrócitos por animal, em microscópio de luz com aumento 100x. Com esta coloração, as células se coram em verde e os micronúcleos são facilmente identificados com a coloração rosa intensa. Foram analisados 2.000 eritrócitos de sangue periférico por animal para a polpa de açaí e 1.000 eritrócitos de sangue periférico por animal para o óleo de buriti, seguindo as recomendações de cada protocolo experimental.

Para o óleo de buriti, uma gota do sangue da veia caudal foi coletada diretamente em uma lâmina previamente preparada com solução de laranja de acridina (Sigma®). Nesta preparação prévia, as lâminas foram aquecidas a 70°C em placa de aquecimento e 10µL de solução aquosa de laranja de acridina (1 mg/mL) foi colocada sobre cada lâmina e espalhada uniformemente sobre a superfície desta lâmina e após este procedimento, as lâminas secaram em temperatura ambiente e foram mantidas em laminário por, no mínimo, 24 horas até o momento da coleta das amostras. Após a coleta do sangue, as lâminas foram cobertas com lamínulas e mantidas a -20°C, No momento da análise, as lâminas foram retiradas do freezer e mantidas até atingirem a temperatura ambiente, quando foram analisadas em microscópio de fluorescência (Zeiss, modelo Axiostrar plus®) equipado com filtro de excitação azul de 488 nm e filtro de barreira de 515 nm, usando a lente objetiva de imersão. Foram analisadas 1.000 células por animal.

Para o teste do micronúcleo em medula óssea, foi utilizado o protocolo de MacGregor et al. (1987). As células da medula óssea foram coletadas com soro fetal bovino (Invitrogen, LTDA), centrifugadas, e o “pellet” foi ressuspensionado em 0,3 mL do sobrenadante para a preparação dos esfregaços

nas lâminas. A partir de uma gota de da solução com células de medula óssea (aproximadamente 5 μ L) foi feito o esfregaço e a lâmina secou em temperatura ambiente. As lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 min. e secas em temperatura ambiente. Foram feitas, no mínimo, três laminas de cada animal. Posteriormente, as lâminas com esfregaço de medula óssea foram coradas com Giemsa (Sigma-Aldrich Co.). As lâminas foram analisadas em teste cego, em microscópio de luz (Zeiss, modelo Primostar®), em aumento de 100x. Dois mil eritrócitos policromáticos (PCE) foram analisados em cada animal, verificando-se o número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (PCEMN). Os critérios para a identificação do micronúcleo em eritrócitos de medula óssea foram o seu tamanho e sua forma. No tamanho, eles devem ter 1/10 a 1/20 do tamanho do PCE. O micronúcleo deve ser arredondado ou oval, com contorno liso e definido (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

3.2.2. ENSAIO DO COMETA

O sangue periférico foi coletado da veia caudal, 4 horas após a injeção intraperitoneal de solução salina ou DXR. As células do fígado e do rim foram coletadas após a eutanásia. As suspensões celulares de cada órgão foram preparadas de acordo com o protocolo descrito por Tice et al. (2000). Assim, 0,2 g de cada órgão foi adicionado a 1 mL de solução de Hanks gelada em uma placa de Petri e cortados em pedaços com uma tesoura. A viabilidade das células hepáticas e renais foi determinada pelo método de exclusão por morte celular, imediatamente antes da realização do ensaio do cometa, de acordo com a metodologia proposta por Burlinson et al. (2007). Em células viáveis, o azul de tripan (Sigma-Aldrich Co) não é absorvido; entretanto, é capaz de

atravessar a membrana de uma célula morta. A viabilidade celular foi sempre acima de 80% para cada suspensão celular, nos grupos tratados e nos grupos controles.

O ensaio do cometa foi realizado em condições alcalinas, de acordo com Singh et al. (1988) e com as recomendações para o uso do ensaio do cometa em Toxicologia Genética (Tice et al., 2000). Após o isolamento das células, adicionou-se solução de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Gibco, Gaithersburg, MD, USA). Transferiu-se 80µL da mistura para uma lâmina convencional pré-coberta com agarose 1,5%, cobrindo-a com uma lamínula (24 x 60mm). As lâminas foram mantidas a temperatura de 4°C por 5 min. e imersas em solução de lise recém preparada, contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris, pH 10 por, no mínimo, 60 min. a 4°C. Após a lise, as lâminas permaneceram em uma cuba de eletroforese horizontal, submersas em uma solução contendo 300 mM NaOH e 1 mM EDTA, pH>13, por 20 min. Após este período, iniciou-se a corrida de um campo elétrico de 1 V/cm (25 V, 300 mA por 20 min). Subsequentemente, as lâminas foram lavadas em solução tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos, secas em temperatura ambiente e guardadas até o momento da análise. Cada lâmina foi corada com 30 µL de solução de brometo de etídio (20 µg/mL) e analisadas imediatamente. Todos os passos foram conduzidos no escuro ou com o mínimo de luz. Os nucleóides foram identificados em microscópio de fluorescência (Zeiss, modelo AxioStar Plus®) equipado com filtro de excitação de 516-560nm e filtro de barreira de 590nm, com aumento de 400X.

Para a polpa de açaí, a análise dos cometas foi realizada por escore visual e pelo mesmo analista. Foram analisados 100 nucleóides a partir de

duas lâminas em código cego, por animal. Os nucleóides foram distribuídos em uma das cinco classes, de acordo com o comprimento e intensidade da cauda. Para análise visual dos cometas, o comprimento da cauda em relação ao diâmetro da cabeça foi utilizado para distribuir os nucleóides, de acordo com a classificação descrita por Collins et al, (1995), sendo:

Classe 0: sem cauda

Classe 1: cauda com um comprimento menor que o diâmetro da cabeça do cometa

Classe 2: cauda com um comprimento entre 1 e 2 vezes o diâmetro da cabeça do cometa

Classe 3: cauda com um comprimento maior que 2 vezes o diâmetro da cabeça do cometa

Classe 4: cauda com extenso comprimento e cabeça com pequeno diâmetro

O Índice de Danos ao DNA (ID) foi obtido pela multiplicação do número de células em cada classe pelo dano da classe, de acordo com a seguinte fórmula:

ID = $(0 \times n_0) + (1 \times n_1) + (2 \times n_2) + (3 \times n_3) + (4 \times n_4)$, onde n representa o número de núcleóides e o nível de danos de 0 a 4 (COLLINS et al., 1995).

Para o óleo de buriti, foram analisadas 100 nucleóides por animal, pelo escore automatizado. As imagens obtidas no microscópio de fluorescência foram coletadas por uma câmera acoplada ao microscópio (Axio Cam MRc - AxioVision 3.1) e submetidas à análise por sistema de imagem (CometScore®, versão 1.5, TriTek Corporation, disponível no endereço http://autocomet.com/products_cometscore.php). O parâmetro selecionado para análise foi a intensidade da cauda (% DNA na cauda).

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todos os resultados obtidos neste trabalho foram verificados quanto à normalidade pelo teste KS (Teste Kolmogorov Smirnov). O software estatístico utilizado foi o GraphPad Prism, versão 2.01 para Windows, GraphPad Software® (San Diego, Califórnia, USA).

Para a polpa de açaí, os dados foram analisados pelo teste de análise de variância (ANOVA), seguido pelo teste de Tukey. Para o óleo de buriti, os dados foram analisados pelo teste não paramétrico Kruskal Wallis e pós teste de Dunn's. Em ambos os casos, os valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos para todos os parâmetros avaliados.

4. RESULTADOS

4. RESULTADOS

4.1. POLPA DE AÇAÍ

4.1.1. POLPA DE AÇAÍ: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

Os cromatogramas demonstrando a caracterização dos pigmentos contidos na polpa de açaí estão expressos na Figura 1. Foram identificados e caracterizados: compostos fenólicos totais, antocianinas totais, flavonóides totais, carotenóides totais e seus constituintes majoritários, em suas respectivas concentrações (Figura 1 e Tabela 2).

Figura 1: Cromatogramas da polpa de açaí obtidos por HPLC-PDA-MS/MS.

(A) Compostos polifenóis, 350nm. Picos de identificação: 1. ácido gálico, 2. ácido benzóico, 3. catequina, 4. não identificado, 5. taxifolina 3-ramnosídeo, 6. luteolina 8-glucosídeo, 7. apigenina 6-glucosídeo. (B) Carotenóides, 450nm. Picos de identificação: 1. *trans*-luteína, 2. 13-*cis*- β -caroteno, 3. *trans*- α -caroteno, 4. *trans*- β -caroteno, 5. 9-*cis*- β -caroteno. (C) Antocianinas, 520 nm. Picos de identificação: 1. cianidina 3-glucosídeo, 2. cianidina-3-rutinosídeo.

Tabela 2: Composição fitoquímica da polpa de açaí

Componentes	Concentração (mg/100g)	Componentes majoritários (mg/100g)
Carotenóides Totais	0,52 ± 0,02	luteína (0,15±0,005), α -caroteno (0,045±0,003), β -caroteno* (0,24±0,01)
Flavonóides Totais	55,9 ± 0,6**	taxifolina 3-ramnosideo (30,3±0,4), luteolina8-glicosídeo (7,3±0,1), apigenina 6-glucosideo (5,2±0,2), catequina (2,1±0,3)
Antocianinas Totais	252,9 ± 10,1	cianidina 3-glicosideo (11,1±0,2), cianidina 3-rutenosideo (241,8±9,9),
Compostos Fenólicos Totais	424,9 ± 8,8***	Ácido gálico (20,7±0,9), Ácido benzóico (9,1±0,8)

*Soma de todos os isômeros trans + cis

** (mg de catequina (CE) /100g)

*** (mg de ácido gálico (GAE) /100g)

4.1.2. POLPA DE AÇAÍ: TESTE DO MICRONÚCLEO

Na Tabela 3, estão expressos os resultados das avaliações do efeito mutagênico e antimutagênico nos tratamentos agudo e sub-agudo com a polpa de açaí. Não houve diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre o controle negativo e os grupos tratados com as três doses da polpa de açaí, administradas isoladas, na frequência de MN em células da medula óssea e em sangue periférico, o que demonstra a ausência de efeito mutagênico. O grupo DXR mostrou um aumento significativo ($p < 0,05$) no número de MN comparado com o controle negativo, tanto no tratamento agudo como no tratamento sub-agudo e nas duas matrizes biológicas (Tabela 3). Os

tratamentos simultâneos com uma única administração de açaí + DXR, demonstraram diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) na frequência de MN induzidos pela DXR em células de medula óssea e em células de sangue periférico de camundongos, quando comparados com os grupos tratados apenas com DXR (Tabela 3). A administração aguda da polpa de açaí nas doses de 3,33; 10,0 e 16,17 g/Kg p.c, resultou uma diminuição significativa ($p < 0,05$) na frequência de micronúcleos induzidos pela DXR, quando comparados com os grupos tratados com DXR em células de medula óssea e de sangue periférico.

No tratamento sub-agudo, a administração da polpa de açaí demonstrou baixa frequência de MN, o que demonstra alta proteção, tanto em células de medula óssea quanto em células de sangue periférico, quando comparado com o grupo que recebeu apenas DXR. Os valores encontrados nos tratamentos associados da polpa de açaí e DXR voltaram a frequência basal de MN encontrada nos controles negativos.

Tabela 3: Frequência de MN em eritrócitos de medula óssea e sangue periférico de camundongos *Swiss albinus* tratados com diferentes doses da polpa de açaí isoladamente ou associado com o antitumoral doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c., i.p.), nos tratamentos agudo (única gavagem, 24 horas) e sub-agudo (gavagem por 14 dias)

Tratamentos (n=6)	MN em eritrócitos de medula óssea	MN em eritrócitos de sangue periférico
	MN Média±DP	MN Média±DP
Tratamento Agudo		
Controle Negativo	1,50±0,67	1,33±0,42
Açaí 3,33	1,50±0,43	1,33±0,42
Açaí 10,00	2,00±0,36	1,50±0,56
Açaí 16,67	1,67±0,33	1,33±0,61
Controle Positivo (DXR)	10,00±1,14 ^a	11,17±1,28 ^a
Açaí 3,33 + DXR	5,00±0,8 ^{a,b}	3,00±1,37 ^{a,b}
Açaí 10,00 + DXR	4,67±0,52 ^{a,b}	2,83±0,72 ^b
Açaí 16,67 + DXR	3,83±0,48 ^{a,b}	2,83±0,91 ^b
Tratamento Sub-agudo		
Controle Negativo	2,67±1,03	2,47± 1,44
Açaí 3,33	2,52±1,52	2,16±0,81
Açaí 10,00	2,67±1,63	1,33±1,50
Açaí 16,67	3,33±1,03	1,00±0,63
Controle Positivo (DXR)	11,83±2,92 ^a	11,00±2,61 ^a
Açaí 3,33 + DXR	4,16±1,83 ^{a,b}	4,50±0,55 ^b
Açaí 10,00 + DXR	3,17±1,17 ^b	3,33±1,03 ^b
Açaí 16,67 + DXR	3,14±1,34 ^b	1,50±0,84 ^b

2.000 células foram avaliadas por animal, no total de 12.000 células por grupo em cada tratamento.

^a p< 0.05 comparado com o controle negativo.

^b p< 0.05 comparado com o controle positivo (DXR).

A citotoxicidade foi avaliada pela contagem do número de eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) no total de 500 células por animal. Não foi observada citotoxicidade nem aumento nas freqüências de micronúcleos em células da medula óssea ou em células do sangue periférico, nos grupos que receberam polpa de açaí nos tratamentos agudo e subagudo, quando comparados ao controle negativo (Figura 2).

Figura 2: Gráfico da frequência de PCE/NCE em células de medula óssea de camundongos (n=6) que receberam o tratamento agudo(24 horas) e sub-agudo (14 dias) de diferentes doses da polpa de açaí (gavagem 3,33; 10,0 e 16,67 mg/Kg p.c.) seguido de doxorrubicina (DXR, 16mg/Kg, ip). Ausência de diferença estatística ($p>0,05$) entre o controle negativo e os demais grupos.

4.1.3. POLPA DE AÇAÍ: TESTE DO COMETA

A Tabela 4 mostra o índice de danos ao DNA (ID) em células de sangue

periférico, renais e hepáticas no tratamento agudo. De acordo com os resultados obtidos, foi possível observar ausência de danos ao DNA no controle negativo e nos grupos tratados com polpa de açaí, independente da dose administrada ($p>0,05$), demonstrando ausência de efeitos genotóxicos. Como esperado, os animais tratados com DXR apresentaram alto índice de danos ao DNA ($p<0,05$), comparado com o grupo controle negativo. Na Tabela 4, verifica-se ainda, que a administração de polpa de açaí demonstrou redução estatisticamente significativa ($p<0,05$) na genotoxicidade induzida pela DXR no ensaio do cometa, em células de sangue periférico e renais, quando comparados com o grupo que recebeu apenas DXR. No fígado, apenas a dose mais alta foi capaz de reduzir os danos genotóxicos induzidos pela DXR.

Os resultados do tratamento sub-agudo estão apresentados na Tabela 5. O tratamento sub-agudo com a polpa de açaí + DXR, apresentou tendência de ter sido mais efetivo do que o tratamento agudo, na inibição da genotoxicidade induzida pela DXR. Com os resultados obtidos observou-se redução significativa ($p<0,05$) nos danos induzidos ao DNA, independente do tipo celular analisado.

Tabela 4: Frequência de células com cometas, distribuição das classes de cometa, e índice de dano de DNA em células de sangue periférico, renais e hepáticas de camundongos tratados com diferentes doses da polpa de açaí (g/Kg p.c.) no tratamento agudo (gavagem única) seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia

Órgão	Grupo (n=6)	Células com cometa (%)	Distribuição dos Cometas em classes					ID média±DP
			0	1	2	3	4	
			(%)	(%)	(%)	(%)	(%)	
Sangue	1. Controle Negativo	27,5	72,5	22,8	4,2	0,5	0	0,30±0,12
	2. Açaí 3,33	23,2	76,8	21,8	1,2	0,2	0	0,25±0,13
	3. Açaí 10,00	18,5	81,5	17,7	0,8	0	0	0,19±0,08
	4. Açaí 16,67	36,8	63,2	36,0	0,8	0	0	0,38±0,10
	5. Controle Positivo(DXR)	98,5	1,5	55,5	33,2	7,0	2,8	1,54±0,14 ^a
	6. Açaí 3,33+ DXR	28,9	71,1	27,7	1,2	0	0	0,30±0,09 ^b
	7. Açaí 10,00+ DXR	34,1	65,9	32,3	1,8	0	0	0,36±0,06 ^b
	8. Açaí 16,67+ DXR	38,0	62,0	36,8	1,2	0	0	0,39±0,12 ^b
Rim	1. Controle Negativo	16,0	84,0	13,8	2,2	0	0	0,18±0,09
	2. Açaí 3,33	29,8	70,2	28,8	1,0	0	0	0,30±0,13
	3. Açaí 10,00	29,3	70,7	22,3	6,5	0,3	0,2	0,37±0,20
	4. Açaí 16,67	27,7	72,3	22,2	4,8	0,5	0,2	0,34±0,27
	5. Controle Positivo(DXR)	90,4	9,6	44,2	33,0	11,2	2,0	1,52±0,24 ^a
	6. Açaí 3,33+ DXR	91,2	7,9	78,2	12,2	1,7	0	1,08±0,20 ^{a,b}
	7. Açaí 10,00+ DXR	81,9	18,1	77,2	3,0	1,2	0,5	0,89±0,14 ^{a,b}
	8. Açaí 16,67+ DXR	65,9	34,1	58,0	6,8	0,8	0,3	0,76±0,15 ^{a,b}
Fígado	1. Controle Negativo	26,7	73,3	24,0	2,7	0	0	0,29±0,10
	2. Açaí 3,33	37,0	63,0	32,8	4,2	0	0	0,41±0,11
	3. Açaí 10,00	37,5	62,5	28,3	7,5	1,7	0	0,50±0,22
	4. Açaí 16,67	39,5	60,5	28,3	9,3	1,7	0,2	0,53±0,10
	5. Controle Positivo(DXR)	86,4	13,6	45,3	26,2	10,7	4,2	1,46±0,26 ^a
	6. Açaí 3,33+ DXR	84,4	15,6	69,0	13,2	1,7	0,5	1,02±0,07 ^a
	7. Açaí 10,00+ DXR	85,0	15,0	78,3	4,2	2,0	0,5	0,95±0,20 ^{a,b}
	8. Açaí 16,67+ DXR	72,2	27,8	66,7	5,5	0	0	0,78±0,21 ^{a,b}

ID= Índice de danos ao DNA.

100 células foram analisados por animal, no total de 600 células por grupo.

^a p<0.05 comparado com o controle negativo.

^b p<0.05 comparado com o controle positivo.

Tabela 5: Frequência de células com cometas, distribuição das classes de cometa, e índice de dano de DNA em células de sangue periférico, renais e hepáticas de camundongos tratados com diferentes doses da polpa de açaí (g/Kg p.c.) no tratamento sub-agudo (gavagem por 14 dias) seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia

Órgão	Grupo (n=6)	Células com cometa (%)	Distribuição dos Cometas em classes					ID média±DP
			0 (%)	1 (%)	2 (%)	3 (%)	4 (%)	
Sangue	9. Controle Negativo	19,8	80,2	19,8	0	0	0	0,20±0,13
	10. Açaí 3,33	19,8	80,2	19,3	0,5	0	0	0,20±0,15
	11. Açaí 10,00	18,6	81,4	18,3	0,3	0	0	0,20±0,08
	12. Açaí 16,67	25,4	74,6	24,7	0,7	0	0	0,26±0,13
	13. Controle Positivo(DXR)	94,2	5,80	72,7	18,0	2,2	1,3	1,21±0,21 ^a
	14. Açaí 3,33+ DXR	21,7	78,3	20,2	1,2	0,3	0	0,24±0,10 ^b
	15. Açaí 10,00+ DXR	33,0	67,0	31,2	1,8	0	0	0,35±0,07 ^{a,b}
Rim	16. Açaí 16,67+ DXR	42,6	57,4	42,3	0,3	0	0	0,43±0,06 ^{a,b}
	9. Controle Negativo	16,7	83,3	16,5	0,2	0	0	0,17±0,07
	10. Açaí 3,33	28,7	71,3	28,5	0,2	0	0	0,29±0,06
	11. Açaí 10,00	17,7	82,3	17,2	0,5	0	0	0,18±0,10
	12. Açaí 16,67	41,4	58,6	41,1	0,3	0	0	0,41±0,12
	13. Controle Positivo(DXR)	99,3	0,7	79,7	16,8	1,8	1,0	1,23±0,07 ^a
	14. Açaí 3,33+ DXR	23,8	76,2	23,8	0	0	0	0,24±0,11 ^b
Fígado	15. Açaí 10,00+ DXR	22,0	78,0	21,0	0,7	0,3	0	0,23±0,09 ^b
	16. Açaí 16,67+ DXR	18,3	81,7	18,0	0,3	0	0	0,19±0,05 ^b
	9. Controle Negativo	28,2	71,8	27,7	0,5	0	0	0,29±0,24
	10. Açaí 3,00	10,3	89,7	10,3	0	0	0	0,10±0,05
	11. Açaí 10,00	10,5	89,5	9,3	1,2	0	0	0,12±0,08
	12. Açaí 16,67	21,1	78,9	20,3	0,3	0,5	0	0,23±0,14
	13. Controle Positivo(DXR)	94,3	5,7	70,2	18,7	4,2	1,2	1,25±0,06 ^a
	14. Açaí 3,33+ DXR	42,1	57,9	41,8	0,3	0	0	0,43±0,02 ^b
	15. Açaí 10,00+ DXR	34,7	65,3	34,7	0	0	0	0,35±0,03 ^b
	16. Açaí 16,67+ DXR	36,2	63,8	36,0	0,2	0	0	0,36±0,02 ^b

ID= Índice de danos ao DNA .

100 células foram analisados por animal, no total de 600 células por grupo.

^a p<0.05 comparado com o controle negativo.

^b p<0.05 comparado com o controle positivo (DXR).

4.2. ÓLEO DE BURITI

4.2.1. ÓLEO DE BURITI: CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA

Os cromatogramas demonstrando a caracterização dos pigmentos contidos no óleo de buriti estão expressos na Figura 3. Foram identificados e caracterizados: compostos tocoferóis, carotenóides totais e compostos fenólicos totais (Figura 3 e Tabela 6).

Figura 3. Cromatogramas do óleo de buriti obtidos por HPLC-DAD. Picos de identificação: 1. *all-trans*-luteína, 2. fitoeno, 3. *cis*-fitoflueno, 4. *all-trans*- fitoflueno, 5. 15-*cis*- β -caroteno, 6. 13-*cis*- β -caroteno, 7. *all-trans*- α -caroteno, 8. 9-*cis*- α -caroteno, 9. *all-trans*- β -caroteno, 10. 9-*cis*- β -caroteno.

Tabela 6: Composição fitoquímica do óleo de buriti

Componentes	Concentração (mg/100g) [*]
α -tocoferol	89,7 $\pm$ 0,03
β - tocoferol	46,6 $\pm$ 0,1
γ - tocoferol	9,9 $\pm$ 0,2
δ - tocoferol	5,0 $\pm$ 0,04
Carotenóides Totais	56,6 $\pm$ 4,4
Compostos Fenólicos Totais ^{**}	30,3 $\pm$ 6,6

^{*} Média e desvio padrão das análises em triplicata

^{**} mg de ácido gálico (GAE)/100 g do óleo de buriti

4.2.2. ÓLEO DE BURITI: TESTE DO MICRONÚCLEO

Na Tabela 7, estão expressos os resultados das avaliações do efeito mutagênico e antimutagênico do óleo de buriti nos tratamentos agudo e sub-agudo. Em ambos os tratamentos, foi possível observar que as três doses testadas do óleo de buriti não foram mutagênicas pelo teste do micronúcleo em células medula óssea e de sangue periférico de camundongos Swiss, pois, a frequência de micronúcleos do grupo controle negativo e dos grupos tratados com óleo de buriti foram semelhantes, sem diferença estatística ($p > 0,05$).

O grupo DXR, usado como controle positivo, apresentou aumento significativo na frequência de micronúcleos ($p < 0,05$) em relação ao controle negativo e em relação ao grupo tratado com óleo de milho, nos diferentes tecidos, no tratamento agudo e no tratamento sub-agudo (Tabela 7).

A frequência de micronúcleos do grupo controle negativo e do grupo óleo de milho foram semelhantes, sem diferença estatística ($p > 0,05$), demonstrando que o uso do óleo de milho como solvente não induziu e nem

aumentou a frequência de micronúcleos, ou seja, o óleo de milho não demonstrou efeito mutagênico, tanto no tratamento agudo como no tratamento sub-agudo. No entanto, no teste do micronúcleo em sangue periférico, no tratamento agudo e no tratamento sub-agudo e em medula óssea, no tratamento sub-agudo, as três associações de óleo de buriti + DXR e a associação óleo de milho + DXR, demonstraram diferença estatística ($p < 0,05$), quando comparados com o grupo que recebeu apenas óleo de milho, indicando que o óleo de buriti protegeu os danos ao DNA induzidos pela DXR porém, o óleo de milho como solvente influenciou neste efeito protetor.

No teste do micronúcleo em medula óssea, nos dois protocolos de tratamento, nos três grupos tratados com associação de óleo de buriti (100, 200 e 300 mg/Kg p.c.) + DXR, houve redução na frequência do número de micronúcleos, embora não tenha sido observada diferença estatística quando comparados com o grupo DXR ($p > 0,05$), indicando ausência de proteção do óleo de buriti frente aos danos ao DNA induzidos pela DXR.

A ausência de citotoxicidade em ambos os tratamentos foi avaliada em células de medula óssea, pela contagem do número de eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) no total de 500 células por animal. As doses testadas de óleo de buriti e os tratamentos associados de óleo de buriti + DXR não foram citotóxicas ($p > 0,05$) (Figura 4).

Tabela 7: Frequência de MN em eritrócitos de medula óssea e sangue periférico de camundongos *Swiss albinus* tratados com diferentes doses do óleo de buriti isoladamente ou associado com o antitumoral doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c., i.p.), nos tratamentos agudo (única gavagem, 24 horas) e sub-agudo (gavagem por 14 dias).

Grupo (n=6)	MN em eritrócitos de medula óssea	MN em eritrócitos de sangue periférico
	MN Média±DP	MN Média±DP
Tratamento Agudo		
1. Controle Negativo	2,83 ± 1,94	2,67 ± 1,37
2. Óleo de milho	3,67 ± 1,63	4,17 ± 2,14
3. Óleo de buriti 100 mg/kg p.c.	6,33 ± 2,94	4,83 ± 2,71
4. Óleo de buriti 200 mg/kg p.c.	5,67 ± 3,61	2,33 ± 2,16
5. Óleo de buriti 300 mg/kg p.c.	6,66 ± 2,94	3,17 ± 1,32
6. Controle Positivo (DXR)	15,67 ± 5,35 ^{a,b}	23,17 ± 3,18 ^{a,b}
7. Óleo de milho + DXR	8,66 ± 3,93 ^{a,b}	17,67 ± 4,92 ^{a,b}
8. Óleo de buriti 100 + DXR	6,67 ± 2,25	7,83 ± 1,17 ^{c,d}
9. Óleo de buriti 200 + DXR	5,66 ± 0,82	6,67 ± 3,26 ^{c,d}
10. Óleo de buriti 300 + DXR	6,33 ± 1,63	7,00 ± 2,28 ^{c,d}
Tratamento Sub-agudo		
11. Controle Negativo	2,50 ± 1,38	2,67 ± 1,96
12. Óleo de milho	3,50 ± 1,64	3,33 ± 3,07
13. Óleo de buriti 100 mg/kg p.c.	5,50 ± 0,84	8,50 ± 3,08
14. Óleo de buriti 200 mg/kg p.c.	5,83 ± 0,75	6,67 ± 1,63
15. Óleo de buriti 300 mg/kg p.c.	6,33 ± 0,52	1,67 ± 1,63
16. Controle Positivo (DXR)	17,33 ± 2,33 ^{a,b}	22,83 ± 2,78 ^{a,b}
17. Óleo de milho + DXR	10,00 ± 1,55 ^{a,b}	15,50 ± 3,62 ^{a,b,c}
18. Óleo de buriti 100 + DXR	5,33 ± 0,81 ^c	11,50 ± 2,07 ^{c,d}
19. Óleo de buriti 200 + DXR	6,16 ± 0,37 ^c	5,00 ± 2,97 ^{c,d}
20. Óleo de buriti 300 + DXR	6,33 ± 0,81 ^c	5,50 ± 3,04 ^{c,d}

2.000 eritrócitos de medula óssea foram avaliados por animal, no total de 12.000 células por grupo em cada tratamento. 1.000 eritrócitos de sangue periférico foram avaliados por animal, no total de 6.000 células por grupo em cada tratamento.

^a diferente do grupo controle negativo (p< 0,05).

^b diferente do grupo óleo de milho (p<0,05).

^c diferente do grupo DXR (p<0,05).

^d diferente do grupo óleo de milho + DXR (p<0,05).

Figura 4: Gráfico da frequência de PCE/NCE em células de medula óssea de camundongos (n=6) que receberam o tratamento agudo (24 horas) e sub-agudo (14 dias) de diferentes doses do óleo de buriti (gavagem 100, 200 e 300 mg/Kg p.c.) seguido de doxorrubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia. Ausência de diferença estatística ($p>0,05$) entre todos os grupos comparados com o grupo óleo de milho.

4.2.2. ÓLEO DE BURITI: ENSAIO DO COMETA

As Tabelas 8 e 9 apresentam as médias da % de DNA na cauda dos nucleóides em células de sangue periférico, renais e hepáticas, no tratamento agudo e no tratamento sub-agudo, respectivamente. Em ambos os tratamentos, a % de DNA na cauda nos grupos tratados com as diferentes

doses do óleo de buriti (100, 200 e 300 mg/kg p.c.) e com o óleo de milho foram semelhantes ao controle negativo ($p>0,05$), demonstrando ausência de efeitos genotóxicos. Como esperado, nos dois protocolos de tratamento, os animais tratados com DXR apresentaram alta % de DNA na cauda, diferindo estatisticamente do grupo controle negativo ($p<0,05$).

No tratamento agudo (Tabela 8), nas células de sangue periférico, hepáticas e renais, os grupos tratados com a associação de óleo de buriti + DXR, não mostraram diferença estatística ($p>0,05$) quando comparados com o grupo óleo de milho + DXR, portanto, não houve proteção do óleo de buriti frente aos danos ao DNA induzidos pela DXR.

No tratamento sub-agudo (Tabela 9), nas células sanguíneas, observou-se redução na % de DNA na cauda, quando comparados os grupos que receberam a associação de óleo de buriti + DXR em relação ao grupo tratado com a associação óleo de milho + DXR ($p<0,05$), demonstrando a ação protetora do óleo de buriti frente a genotoxicidade induzida pela DXR, nas doses de 100, 200 e 300 mg/Kg p.c. Nas células hepáticas e renais, nos grupos tratados com as associações de óleo de buriti + DXR, observou-se redução na % de DNA na cauda, comparados com o grupo óleo de milho + DXR, sem diferença estatística ($p>0,05$), demonstrando ausência de ação protetora frente aos danos ao DNA induzidos pela DXR.

Ainda no tratamento sub-agudo (Tabela 9), é possível observar a clara influência do efeito protetor do óleo de milho usado como solvente em células sanguíneas, renais e hepáticas, pois, a % de DNA na cauda dos grupos tratados com óleo de buriti + DXR apresentou diferença estatística significativa do grupo tratado com DXR ($p<0,05$).

Tabela 8: % de DNA na cauda de células de sangue periférico, rins e fígado de camundongos tratados com diferentes doses de óleo de buriti (100; 200 e 300 mg/Kg p.c.) no tratamento agudo (gavagem única), seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia, pelo ensaio do cometa

Órgão	Grupos (n=6)	%DNA na cauda média±DP
Sangue	Controle Negativo	7,40 ± 1,65
	Óleo de milho	9,75 ± 3,26
	Óleo de buriti 100 mg/kg p.c.	11,27 ± 3,32
	Óleo de buriti 200 mg/kg p.c.	12,80 ± 6,33
	Óleo de buriti 300 mg/kg p.c.	9,71 ± 2,90
	Controle Positivo (DXR)	18,34 ± 3,62 ^{a,b}
	Óleo de milho + DXR	13,35 ± 5,56 ^{a,b}
	Óleo de buriti 100 + DXR	5,20 ± 1,10 ^c
	Óleo de buriti 200 + DXR	5,34 ± 3,45 ^c
	Óleo de buriti 300 + DXR	5,84 ± 2,04 ^c
Rim	Controle Negativo	1,94 ± 0,85
	Óleo de milho	3,11 ± 2,19
	Óleo de buriti 100 mg/kg p.c.	2,20 ± 0,71
	Óleo de buriti 200 mg/kg p.c.	2,16 ± 0,34
	Óleo de buriti 300 mg/kg p.c.	2,02 ± 1,34
	Controle Positivo (DXR)	10,94 ± 5,63 ^a
	Óleo de milho + DXR	8,34 ± 4,23 ^a
	Óleo de buriti 100 + DXR	4,31 ± 2,36
	Óleo de buriti 200 + DXR	3,05 ± 1,56
	Óleo de buriti 300 + DXR	4,44 ± 1,33
Fígado	Controle Negativo	4,16 ± 1,89
	Óleo de milho	3,57 ± 2,39
	Óleo de buriti 100 mg/kg p.c.	5,01 ± 1,16
	Óleo de buriti 200 mg/kg p.c.	3,23 ± 1,27
	Óleo de buriti 300 mg/kg p.c.	3,07 ± 1,19
	Controle Positivo (DXR)	10,98 ± 4,59 ^a
	Óleo de milho + DXR	6,45 ± 3,49 ^{a,b}
	Óleo de buriti 100 + DXR	5,26 ± 2,0,76
	Óleo de buriti 200 + DXR	4,81 ± 2,37
	Óleo de buriti 300 + DXR	4,68 ± 1,98

DP: desvio padrão; 100 nucleóides foram analisados por animal, no total de 600 células por grupo. ^a diferente do grupo controle negativo (p< 0,05).

^b diferente do grupo óleo de milho (p<0,05).

^c diferente do grupo DXR (p<0,05).

^d diferente do grupo óleo de milho + DXR (p<0,05).

Tabela 9: % de DNA na cauda de células de sangue periférico, rins e fígado de camundongos tratados com diferentes doses de óleo de buriti (100; 200 e 300 mg/Kg p.c.) no tratamento sub-agudo (gavagem por 14 dias) seguido de doxorubicina (DXR, 16mg/Kg, ip), 24 horas antes da eutanásia, pelo ensaio do cometa.

Órgão	Grupos (n=6)	%DNA na cauda média±DP
Sangue	Controle Negativo	4,26 ± 0,72
	Óleo de milho	4,97 ± 2,71
	Óleo de buriti 100 mg/kg p.c.	7,39 ± 2,38
	Óleo de buriti 200 mg/kg b.m.	6,13 ± 2,06
	Óleo de buriti 300 mg/kg b.m.	5,50 ± 0,92
	Controle Positivo (DXR)	13,48 ± 5,70 ^a
	Óleo de milho + DXR	15,38 ± 4,18 ^{a,b}
	Óleo de buriti 100 + DXR	5,32 ± 0,37 ^{c,d}
	Óleo de buriti 200 + DXR	4,87 ± 1,28 ^{c,d}
	Óleo de buriti 300 + DXR	4,55 ± 0,88 ^{c,d}
Rim	Controle Negativo	5,46 ± 1,59
	Óleo de milho	3,02 ± 0,61
	Óleo de buriti 100 mg/kg p.c.	3,25 ± 0,70
	Óleo de buriti 200 mg/kg b.m.	2,29 ± 0,74
	Óleo de buriti 300 mg/kg b.m.	3,09 ± 1,49
	Controle Positivo (DXR)	10,92 ± 3,23 ^a
	Óleo de milho + DXR	7,86 ± 2,38 ^{a,b}
	Óleo de buriti 100 + DXR	5,29 ± 1,72 ^c
	Óleo de buriti 200 + DXR	4,79 ± 1,20 ^c
	Óleo de buriti 300 + DXR	5,74 ± 1,13 ^c
Fígado	Controle Negativo	4,50 ± 2,34
	Óleo de milho	4,40 ± 3,29
	Óleo de buriti 100 mg/kg p.c.	1,42 ± 0,63
	Óleo de buriti 200 mg/kg b.m.	2,40 ± 1,46
	Óleo de buriti 300 mg/kg b.m.	4,33 ± 3,61
	Controle Positivo (DXR)	13,44 ± 4,62 ^a
	Óleo de milho + DXR	9,84 ± 4,29 ^{a,b}
	Óleo de buriti 100 + DXR	5,76 ± 4,10 ^c
	Óleo de buriti 200 + DXR	4,97 ± 4,35 ^c
	Óleo de buriti 300 + DXR	4,37 ± 3,78 ^c

DP: desvio padrão; 100 nucleóides foram analisados por animal, num total de 600 células por grupo. ^a diferente do grupo controle negativo (p< 0,05). ^b diferente do grupo óleo de milho (p<0,05). ^c diferente do grupo DXR (p<0,05). ^d diferente do grupo óleo de milho + DXR (p<0,05).

5. DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Em sistemas *in vivo*, o uso de camundongos é um modelo experimental amplamente difundido e reconhecido em diversas pesquisas biológicas. Em busca da segurança dos usuários, por meio dos testes *in vivo*, é possível prever, com algumas limitações, os possíveis efeitos de um composto, benéficos ou danosos, antes da administração direta ao homem, fornecendo dados quanto aos riscos de exposição. Além de ser um modelo onde ocorrem todas as fases do metabolismo de determinado composto, há também uma similaridade do genoma humano com o genoma de camundongos. Atualmente, as evoluções atingidas com o uso de técnicas em camundongos permitem o surgimento de ilimitadas possibilidades para estudos de funções fisiológicas e fisiopatológicas (HOYT et al. 2007).

A comunidade científica tem como desafio buscar outros modelos experimentais alternativos, diminuindo e substituindo o uso de animais em experimentos *in vivo* (HAYASHI et al., 2007; PFUHLER et al.; 2009). Porém, até o momento, ainda não há um modelo tão eficiente e próximo do que realmente acontece no organismo humano e que possa substituir os testes *in vivo* e cita-se que o camundongo, além de ser o modelo mais utilizado é também o mais profundamente conhecido cientificamente (CHORILLI; MICHELIN; SALGADO, 2007). No desenvolvimento de intervenções dietéticas efetivas na prevenção do câncer, é relevante o uso de modelos experimentais em animais, tanto para avaliar e confirmar os resultados *in vitro*, como para ampliar o potencial de aplicação dos testes, que resultam em estudos clínicos e epidemiológicos (HURSTING et al., 2005).

Os testes de toxicologia genética constituem uma bateria de testes de

mutagenicidade, bem definidos, selecionados para identificar agentes químicos, físicos e biológicos, capazes de induzir modificações no material genético, de modo que estas sejam transmitidas às novas células durante o processo de divisão celular (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Na maioria das vezes, os testes de mutagenicidade são empregados para prever o desenvolvimento de câncer, pois uma das teorias de carcinogênese química sugere o desenvolvimento de uma mutação como evento inicial deste processo.

É preciso lembrar que um único ensaio biológico não é suficiente para demonstrar o potencial mutagênico do agente testado. Atualmente, o teste do micronúcleo em células de medula óssea ou em sangue periférico e o ensaio do cometa são os testes de genotoxicidade mais recomendados pelas agências regulatórias para a avaliação do potencial genotóxico de substâncias *in vivo*, sendo o teste do micronúcleo reconhecido como o teste primário e o ensaio do cometa o secundário e adicional em bioensaios *in vivo* (RECIO et al., 2010). No teste do micronúcleo detectam-se lesões que sobreviveram pelo menos um ciclo celular. O ensaio do cometa é considerado mais sensível na avaliação de danos ao DNA por agentes genotóxicos do que o teste do micronúcleo e, dependendo do estágio do ciclo celular, da capacidade de reparo, das características genéticas gerais da célula e do agente analisado, apenas uma fração dos danos induzidos ao DNA podem se transformar em mutações (GOETHEM et al., 1997).

Recomenda-se o uso do mesmo animal para a realização de dois ou mais ensaios e a utilização de vários tecidos do mesmo animal (VASQUEZ 2009). Neste estudo, realizamos dois ensaios distintos em diferentes matrizes

biológicas: teste do micronúcleo em células de medula óssea e sangue periférico, ensaio do cometa em células de sangue periférico, hepáticas e renais. Para o teste do micronúcleo, o uso de células de medula óssea e sangue periférico são parâmetros bem definidos por protocolos experimentais (MAcGREGOR, 1987; HAYASHI, 1991). Pelo ensaio do cometa, é possível detectar danos ao DNA em quase todos os órgãos, incluindo os tecidos não hematopoiéticos, com alta sensibilidade e rapidez (UENO et al. 2007). Optou-se por células hepáticas e renais, pois o fígado é o principal órgão envolvido no metabolismo de diversos compostos e é um dos órgão mais apropriado para ensaios de genotoxicidade (TICE et al., 2000), e os rins exercem importante função na excreção destas substâncias. Ainda, a análise das células do fígado e rim são parâmetros importantes para determinar a ação danosa ou protetora de um composto frente à indução de danos ao DNA causada pela DXR, uma vez que este quimioterápico é cardiotoxico, hepatotóxico, nefrotóxico e neurotóxico em função da formação de radicais livres (PATEL et al., 2010; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010)

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) a via de administração mais apropriada de exposição em estudos de toxicidade com fitoterápicos deve ser aquela que mais se aproxima à exposição humana ambiental (ANVISA, RE nº90, de 16 de março de 2004). Como o açaí e o óleo de buriti são consumidos como alimento na dieta da população Amazônica, optou-se pela administração por gavagem. Outros fatores decisivos para a escolha desta via de administração foram as recomendações para a realização do teste do micronúcleo em mamíferos (MAcGREGOR,1987) e para o ensaio do cometa *in vivo* (TICE et al. 2000).

Em testes de mutagenicidade, o uso de grupos controle negativo e positivo são parâmetros que devem ser definidos por cada laboratório. No caso do teste do micronúcleo, pelo controle negativo é possível verificar a frequência espontânea de micronúcleos em animais não tratados e também é possível conhecer o efeito de veículos e solventes. O uso de um agente definido como controle positivo é necessário para garantir a resposta adequada do sistema em estudo (MACGREGOR, 1987). Neste caso, como controle negativo, usamos água por gavagem e solução salina via i.p., e como controle positivo a DXR, via i.p. Para as análises com o óleo de buriti, usamos o óleo de milho como solvente, tendo portanto, um grupo tratado apenas com o solvente, avaliando a ação deste sobre os outros tratamentos. O uso de DXR e óleo de milho são parâmetros bem definidos no histórico do Laboratório de Bromatologia e Nutrição da FCFRP- USP (ANTUNES et al. 2000; EVANGELISTA et al. 2004; SENDÃO et al., 2006; ANTUNES et al. 2007; RIBEIRO et al. 2010) .

A doxorubicina (DXR) é um antibiótico da família das antraciclinas, fármacos antineoplásicos, inibidores do crescimento celular, úteis no tratamento do câncer. Também denominada de adriamicina, a DXR é um produto sintético, derivada do fungo *Streptomyces peucetius*. É amplamente utilizada na quimioterapia de alguns tipos de tumores sólidos como câncer de mama, ovário, endométrio e no tratamento de leucemia aguda e linfomas (MINOTTI et al., 2004; VALADARES et al., 2007). É um quimioterápico com ampla aplicação clínica há mais de 30 anos (GRANADO-PRINCIPAL et al., 2010) e o mais usado na rede pública de saúde, no Sistema Único de Saúde do Brasil, contra o câncer de mama (ZORZETTO, 2005). A bile é a principal via de excreção da DXR e seus metabólitos podem ser detectados em baixas

concentrações na urina e não detectados ou detectados em baixas concentrações no plasma (CAINELLI; VALLONE, 2009).

A atividade anti-tumoral da DXR pode ser explicada, principalmente, pela inibição da síntese de DNA, induzindo apoptose nas células cancerosas (CAINELLI; VALLONE, 2009; VALCULOVA et al., 2010). A DXR inibe a atividade da enzima topoisomerase II, intercalando-se entre as bases púricas e pirimidínicas, interrompendo o prolongamento da cadeia de DNA e causando distorções cromossômicas. Estas causam ruptura das cadeias do DNA e impedem a duplicação celular. Com a quebra induzida do DNA, se não houver o devido reparo celular, ocorrem mutações e aberrações cromossômicas em células tumorais e em células normais (ISLAH et al., 2005; ANTUNES et al., 1998; 2005; TAN; PORTER, 2009; CAINELLI; VALLONE, 2009; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010). Em altas concentrações plasmáticas, a formação de radicais livres gerados no metabolismo da DXR causa toxicidade em tecidos normais, principalmente cardiotoxicidade, o que limita a sua administração (COSTA et al., 2004; PAI; NAHATA, 2000; PARK et al. 2007; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010).

Muitos compostos fitoquímicos com atividade antioxidante têm mostrado efeitos benéficos durante a terapia com DXR, sem diminuir sua eficácia diante das células tumorais (PATEL et al., 2010; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010). A diminuição do efeito mutagênico da DXR em células não tumorais tem sido estudada experimentalmente, em tratamentos combinados de DXR com substâncias antioxidantes, que são capazes de neutralizar a ação danosa dos radicais livres por ela gerados (AMARA-MOKRANE et al., 1996; ANTUNES; TAKAHASHI, 1998; ANTUNES et al., 2007; VALADARES et al.,

2007; PATEL et al., 2010). Um agente citoprotetor ideal seria aquele capaz de permitir a intensificação da dose do quimioterápico; proteger um amplo espectro de órgãos e tecidos; conferir proteção específica aos tecidos normais; preservar o efeito anti-tumoral e ter toxicidade baixa e/ou controlável (SOUZA et al., 2007).

Além de ser um potente agente antineoplásico, a DXR também é amplamente usada em pesquisas experimentais como controle positivo (BRIEN et al., 1987; ALMEIDA et al., 2008). A produção de radicais livres, causando diferentes tipos de danos celulares e quebra do DNA, originando mutações e aberrações cromossômicas, neste caso, é um efeito interessante e um parâmetro usado para comparação em muitos estudos, na avaliação de mutagenicidade e genotoxicidade de compostos (KEIZER et al., 1990; ISLAH et al., 2005 RESENDE et al., 2007, SANTOS et al., 2007, FURTADO, 2008; BARCELOS et al., 2009; SERPELONI, et al., 2010; RIBEIRO, et al. 2010).

A dose administrada de DXR foi 16mg/kg p.c., baseando-se na sua eficácia de indução de danos cromossômicos em roedores (PRAHALATHAN et al., 2006). A administração de uma dose maior de DXR é desnecessária, pois na clínica, a DXR não deve ser administrada em altas doses devido ao seu potencial cardiotoxico (PAI; NAHATA, 2000; PARK et al. 2007; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010). Tal como esperado, a DXR induziu um aumento significativo na frequência de danos ao DNA, quando comparada aos grupos do controle negativo, em todos os tratamentos e em todos os parâmetros analisados. A aplicação por via i.p. é a via de exposição mais comumente usada para este objetivo em função da sua ampla distribuição pelos tecidos alvos (MAcGregor, 1987).

As doses administradas da polpa de açaí e do óleo de buriti foram definidas em ensaios pilotos, observando-se ausência de sinais clínicos de toxicidade, tais como perda de peso, diarreia, falta de apetite ou de ingestão de água e também observando os resultados do teste do micronúcleo em medula óssea e do ensaio do cometa. No teste do micronúcleo, observou-se ausência de citotoxicidade de acordo com a relação PCE/NCE. No ensaio do cometa a viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão por morte celular com azul de tripan e demonstrou valores acima de 80% de células viáveis.

O tempo de 24 horas para o tratamento agudo e de 14 dias para o tratamento sub-agudo foi selecionado de acordo com Casarett; Doull's (2008), que define os períodos de tratamentos para ensaios toxicológicos. No tratamento agudo recomenda-se uma única administração do agente e a coleta do material em estudo em 24 horas e no tratamento sub-agudo, o tempo de exposição para doses repetidas do agente é de até um mês. A coleta das amostras de cada tecido foi determinada de acordo com as recomendações dos protocolos para o teste do micronúcleo e para o ensaio do cometa (MAcGREGOR, 1987; HAYASHI, 1991; TICE, 2000).

No teste do micronúcleo em medula óssea, a toxicidade celular é normalmente indicada pela diminuição da proporção PCEs/NCEs. De acordo com Gollapudi; Mcfadden (1995), o número de PCEs no controle positivo não deve ser inferior a 20% do controle negativo. Em ambos os tratamentos com a polpa de açaí e com o óleo de buriti, os resultados encontrados estão em concordância com esta padronização, não indicando citotoxicidade.

No ensaio do cometa, tanto nos tratamentos com a polpa de açaí como com o óleo de buriti, logo após a coleta das células hepáticas e renais realizou-

se o ensaio de viabilidade celular pelo método de exclusão por morte celular com azul de tripan, com resultados acima de 80% para os animais tratados com a polpa de açaí e 75% para os tratamentos com óleo de buriti. Estes resultados estão nos limites aceitáveis e recomendados pela literatura, no qual recomenda-se que o ensaio do cometa seja realizado com viabilidade celular acima de 70% (TICE, 2000; BURLINSON et al, 2007; FERREIRA et al, 2007).

Este é o primeiro estudo que investigou o efeito mutagênico e o efeito genotóxico da polpa de açaí e do óleo de buriti, usando o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa *in vivo* frente aos danos induzidos pela DXR.

5.1. POLPA DE AÇAÍ

Nota-se que as doses administradas de polpa de açaí (3,33; 10,0 e 16,67 mg/kg p.c.), de acordo com este delineamento experimental, são relativamente mais elevadas do que as doses utilizadas normalmente no teste do micronúcleo, sendo o recomendado a administração máxima de 2.000 mg/kg/dia ou a dose letal (DL50) ou o limite de solubilidade do composto em análise (MAcGREGOR, 1987; HAYASHI, 1991). O objetivo do uso destas doses foi utilizar doses próximas àquelas que podem ser alcançadas pela exposição humana ao açaí. Assim, as doses da polpa de açaí foram selecionadas a partir do estudo realizado por Kahyat (2005), que estimou o consumo individual diário de açaí em uma população brasileira do Estado do Pará (500 mL/dia). A ausência de sinais de toxicidade e de citotoxicidade no teste do micronúcleo em medula óssea foram os fatores decisivos para a escolha das doses a serem testadas.

Em estudo recente, Schauss et al., (2010), avaliaram os efeitos

biológicos de uma bebida a base de açaí fortificada com o produto funcional glicosamina disponível no comércio (MonaVie Active®), usando ensaios toxicológicos *in vitro* e *in vivo*. Os testes *in vitro* foram o ensaio de mutação bacteriana reversa, ensaio de aberrações cromossômicas, ensaio de mutação genética em células de mamíferos e *in vivo* o ensaio do micronúcleo em medula óssea de camundongos BALB/c, estudo de toxicidade oral agudo (5 dias) e estudo de toxicidade sub-crônico (90 dias). Em todos os ensaios, os resultados foram negativos e o composto não foi mutagênico, citotóxico, genotóxico e, de acordo com os ensaios de toxicidade, estabeleceu-se que a dose letal (DL50) foi superior à 20.000 mg/kg p.c. e o NAEL (“No Adverse Effect Level”), ou, seja, o nível para o qual não se apresentam efeitos adversos, foi determinado em 40 g/kg p.c./dia para ratos machos e fêmeas, pois foi a dose mais alta testada até este momento. Com base nestes dados, as doses selecionadas para as gavagens com a polpa de açaí em camundongos são doses aceitáveis para os ensaios propostos e não apresentaram sinais de toxicidade.

Na análise dos micronúcleos em medula óssea a polpa de açaí não apresentou efeito mutagênico nas doses testadas, tanto no protocolo de tratamento agudo como no sub-agudo. Observa-se que houve uma redução significativa nos danos ao DNA em todos os parâmetros avaliados, o que indica ação protetora da polpa de açaí frente aos danos ao DNA induzidos pela DXR. Em concordância com estes resultados, cita-se o estudo de Schauss et al., (2010) e Ribeiro et (2010).

A detecção de micronúcleos em esfregaços de células sanguíneas é outra opção na qual o teste do micronúcleo é amplamente aceito para ratos,

camundongos e humanos (HAYASHI, et al., 2007). No entanto, relata-se sobre a dificuldade de diferenciação entre eritrócitos sanguíneos maduros e jovens em eritrócitos de ratos e humanos, o que não acontece em camundongos, onde ocorre influência da circulação esplênica (HAYASHI, et al., 2007). Em função destes problemas, a realização do teste do micronúcleo em células sanguíneas passou a ser recomendada usando a coloração com laranja de acridina (HAYASHI, et al., 1992).

A coloração com solução de Giemsa é uma opção para a detecção de micronúcleos em células sanguíneas de camundongos. No entanto, neste estudo, optou-se por outra coloração citológica, passível de análise em microscópio de luz, também aceita para a interpretação dos resultados, usando como coloração a reação de Feulgen e contra coloração Fast green®, descrita em alguns estudos (BUENO; PEREIRA; RABELO-GAY, 2000; BUENO; AGOSTINI, 2001; POUL, et al., 2009). Este método, além de ser demorado, exige cuidados quanto ao manuseio dos reagentes e, acredita-se que estas desvantagens sejam fatores limitantes quanto ao seu uso. Uma observação é que, de acordo com a literatura, a maioria dos estudos na qual esta metodologia é aplicada, trata-se de amostras de tecidos sujeitos a maior contaminação por microrganismos, como mucosa bucal e vaginal, epitélio intestinal e sangue de roedores no qual não se tem controle das condições de criadouro. No entanto, é importante ressaltar que é uma opção de coloração citológica na qual não se tem dúvidas quanto à presença de micronúcleos e amplamente aceita.

Os resultados do teste do micronúcleo em sangue periférico foram semelhantes aos resultados obtidos com a medula óssea, demonstrando que

tanto a formação de micronúcleos quanto a atividade antimutagênica da polpa de açaí foram semelhantes nos dois tecidos, em ambos os protocolos de tratamento. A frequência de micronúcleos em sangue periférico normalmente é semelhante àquela observada na medula óssea (MAGREGOR et al., 1987).

Antes da realização deste estudo, não havia relatos na literatura sobre a atividade mutagênica e antimutagênica do açaí *in vivo*. Apenas em um estudo *in vitro*, o açaí demonstrou efeito mutagênico em leveduras (SPADA et al., 2008). Em outro estudo, Spada et al., (2009) relataram que a polpa de açaí atuou na prevenção de danos oxidativos induzidos pelo peróxido de hidrogênio no córtex cerebral, cerebelo e hipotálamo de ratos, sugerindo que os compostos presentes na polpa de açaí devem ser dotados de propriedades neuroprotetoras frente ao estresse oxidativo.

A polpa de açaí não demonstrou atividade genotóxica pelo ensaio do cometa em células sanguíneas, hepáticas e renais de camundongos, nos dois protocolos de tratamento. Em células de sangue periférico e renais, observou-se redução significativa na genotoxicidade induzida pela DXR, tanto no tratamento agudo como no sub-agudo. Porém, em células hepáticas, apenas a dose mais alta foi capaz de reduzir os danos genotóxicos induzidos pela DXR no tratamento agudo. No tratamento sub-agudo, a polpa de açaí foi mais efetiva nas inibições dos danos ao DNA induzidos pela DXR em células hepáticas e renais, quando comparados os resultados com o tratamento agudo. Presume-se que o efeito protetor da polpa de açaí esteja relacionado com sua disponibilidade e acúmulo em diferentes órgãos. Talavéra et al. (2005) investigaram o metabolismo de antocianinas em ratos tratados com uma dieta suplementada por 15 dias, estas foram encontradas no estômago, fígado, rins

e cérebro.

Em estudo recente, observou-se que as antocianinas glicosídeas parecem ser distribuídas pelo sistema circulatório, interagindo diretamente na célula, atravessando a membrana, podendo ser detectadas no interior celular e atuando frente ao efeito de espécies reativas de oxigênio (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^a). Ainda, em estudo realizado em voluntários humanos, a atividade antioxidante do plasma aumentou após a administração da polpa de açaí, demonstrando a absorção dos pigmentos e o efeito antioxidante do açaí (MERTENS-TALCOTT et al., 2008). Segundo a literatura, antioxidantes dietéticos parecem ser mais eficazes quando aplicados em pré-tratamentos, antes da administração do agente genotóxico, justificando os nossos resultados (SALVADORI et al., 1992; TAKEUCHI et al., 2008). De acordo com Nesslany et al. (2007), uma boa resposta pode ser encontrada entre 22 e 26 horas após o tratamento para agentes que precisam de mais tempo para ser absorvido, distribuído e metabolizado. Em concordância, as amostras de células hepáticas e renais foram obtidas 24 horas após os tratamentos i.p.

Mesmo se tratando de tecidos diferentes, cada um com características celulares específicas, observa-se similaridade nos valores de danos ao DNA. Outros estudos descritos na literatura também demonstraram a mesma similaridade. Deepa; Varalakshmi (2006), observaram valores semelhantes aos danos ao DNA em tecido cardíaco e renal de ratos tratados com DXR, e também Nebel et al. (2002) encontraram valores semelhantes em células do fígado e baço de camundongos tratados com a antraciclina idarrubicina.

Embora os mecanismos que esclareçam o efeito antimutagênico e antigenotóxico da polpa de açaí ainda não estejam completamente

esclarecidos, acredita-se que a potente atividade antioxidante do açaí, já mencionada em outros estudos seja responsável pelo efeito demonstrado neste trabalho (COISSON et al., 2005; TOIARI et al., 2005; MATHEUS et al., 2006; ROCHA et al., 2007; RODRIGUES et al., 2006; SCHAUSS et al., 2006; PACHECO-PALENCIA et al., 2007; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^a, SOUSA et al., 2010). Os pigmentos naturais antioxidantes, provavelmente, atuam seqüestrando os radicais livres produzidos pela DXR, pois, sugere-se que os radicais livres gerados pela DXR possam ser os responsáveis pela indução da fragmentação do DNA nas células normais e cancerosas e, ainda, participem de ligações cruzadas no DNA.

Açaí e outros frutos tropicais brasileiros são dotados de alta atividade antioxidante, quando comparados com outros antioxidantes descritos na literatura (RUFINO et al., 2009). A caracterização fitoquímica demonstra que o açaí é rico em antocianinas, sendo cianidina 3-ruteosídeo e cianidina 3-glucosídeo os pigmentos naturais encontrados em maiores concentrações. Este resultado está em concordância com outros estudos realizados anteriormente (SCHAUSS et al. 2006, PACHECO-PALENCIA et al. 2007). As antocianinas formam um complexo DNA-cianidina, que pode ser o possível mecanismo de defesa frente ao dano oxidativo, evitando danos fisiológicos (KONG, 2003). As antocianinas são pigmentos encontrados, principalmente, em flores e frutos de angiospermas, sendo responsáveis por sua coloração azul, vermelha, violeta ou púrpura. Pertencem à classe dos compostos flavonóides que é a classe mais difundida de compostos fenólicos (KONG et al., 2003). São capazes de capturar radicais livres, doando um átomo de hidrogênio, transferindo um elétron ou por meio da quelação de metais

bivalentes, necessários para a produção de radicais livres pela reação de Fenton. Além de antioxidantes, também apresentam propriedades farmacológicas. Diminuem a permeabilidade capilar, atuando como anti-inflamatório e anti-edema, e também apresentam efeitos anticarcinogênico e antiviral (KAPADIA et al., 1997; HAGIWARA et al., 2001). Alguns estudos demonstram sua ação protetora, inibindo a ocorrência de mutações (GASIOROWSKI et al., 2001; YOSHIMOTO et al., 2001; KONCZAK-ISLAM et al., 2003; ADETUTU et al., 2004; AZEVEDO et al., 2006).

Os polifenóis são pigmentos cuja coloração varia do vermelho ao azul e estão presentes em frutos, vegetais e flores. São dotados de potencial antioxidante, sendo capazes de suprimir a formação de radicais livres pela inibição de enzimas ou quelação de íons metálicos envolvidos no início do processo de produção (ROCHA-GUZMÁN et al., 2007). Nas últimas décadas, despertou-se o interesse por pigmentos naturais da classe dos polifenóis, especialmente em função de seus efeitos protetores frente à doenças degenerativas relacionadas com estresse oxidativo (SOUZA et al., 2007), atividade anti-carcinogênica, anti-ulcerosa, anti-trombolítica, anti-inflamatória, antibiótica e vasodilatadora (JONFIA-ESSIEN; WEST; ALDERSON, 2008). O composto fenólico majoritário caracterizado na polpa de açaí foi o ácido gálico, em concordância com Pacheco-Palencia et al., (2007). O ácido gálico tem atividade antimutagênica e anticarcinogênica *in vitro* e *in vivo* (FERGUSON, 2001; MARÍN-MARTINEZ et al., 2009).

Em um estudo recente, a presença de pigmentos polifenóis na polpa de açaí reduziu a proliferação das células leucêmicas humanas da linhagem HL-60, por meio da ativação da caspase-3. Este efeito quimioprotetor está

relacionado não apenas à sua atividade antioxidante, mas também à sua capacidade de mediar outras funções fisiológicas relacionadas com a supressão do câncer, tais como atividade antiproliferativa e antimutagênica, inibição e indução enzimática (DEL POZO-INSFRAN et al., 2006). Em outro caso, a suplementação dietética com polpa de açaí demonstrou melhora nos níveis de biomarcadores do estresse oxidativo e do perfil lipídico em ratos que receberam ração suplementada com 2% de polpa de açaí por 6 semanas (SOUZA et al., 2009). Com base nesses dois casos, nota-se que a polpa de açaí não só contém pigmentos com atividades antioxidantes, como estes pigmentos são bem absorvidos e metabolizados, diminuindo o estresse oxidativo e manifestando-se na proteção frente aos danos oxidativos gerados. Isso justifica o efeito protetor ao DNA frente aos possíveis danos oxidativos induzidos pela DXR encontrados neste trabalho.

5.2. ÓLEO DE BURITI

As doses administradas aos animais foram selecionadas de acordo com as recomendações para a realização do teste do micronúcleo, na qual a dose máxima administrada ao animal deve ser 2.000 mg/kg p.c. ou obedecendo o limite de solubilidade da substância em análise (HAYASHI et al., 2007). O óleo de milho foi escolhido como solvente, pois, de acordo com estudos anteriores, no histórico do nosso laboratório, este se mostrou inócuo, não induzindo ou reduzindo os danos ao DNA na presença do antitumoral cisplatina, em teste de aberrações cromossômicas (EVANGELISTA et al. 2004; SENDÃO et al., 2006). Neste estudo observa-se que houve interferência do solvente, pois os grupos tratados apenas com óleo de milho demonstraram redução nos danos

induzidos pela DXR. Acredita-se que o óleo de milho possui algum mecanismo de proteção frente aos danos ao DNA induzidos pela DXR, ainda não esclarecidos. Assim, sugere-se cautela quanto ao uso do óleo de milho como solvente para outros testes de mutagenicidade e genotoxicidade cujo controle positivo seja a DXR, até que este mecanismo de ação seja elucidado. A composição nutricional do óleo de milho utilizado está no anexo 2 e corresponde às informações fornecidas pelo fabricante.

Pelo teste do micronúcleo em células de medula óssea e em células sanguíneas, no tratamento agudo e no tratamento sub-agudo, as três doses testadas do óleo de buriti (100, 200 e 300 mg/Kg p.c.) não foram mutagênicas. Em células sanguíneas observa-se que houve uma redução significativa nos danos ao DNA induzidos pela DXR no teste do micronúcleo no tratamento agudo e sub-agudo e no teste do cometa, no tratamento sub-agudo.

No teste do micronúcleo em medula óssea, os valores dos controles positivos e negativos estão em concordância com os experimentos realizados com a polpa de açaí (RIBEIRO et al., 2010). Os experimentos com a polpa de açaí e com o óleo de buriti foram realizados em tempos distintos, porém, de acordo com o mesmo delineamento experimental, sendo um tratamento agudo e um sub-agudo, os animais foram mantidos nas mesmas condições de controle de temperatura e umidade e nas mesmas condições dietéticas. A concordância dos resultados nos grupos controles é um importante parâmetro relacionado ao controle de qualidade dos experimentos, garantindo a reprodutibilidade dos testes (MAVOURIN et al., 1994).

Pelo ensaio do cometa, o óleo de buriti não demonstrou atividade genotóxica em células sanguíneas, hepáticas e renais de camundongos, nos

dois protocolos de tratamento. No tratamento sub-agudo, em células de sangue periférico, o óleo de buriti demonstrou atividade antigenotóxica significativa, nas três doses avaliadas.

Os cometas foram analisados por software, e o parâmetro para as comparações estatísticas foi a % de DNA na cauda. A análise dos nucleóides tanto por software como pelo método visual são aceitas para expressar os resultados encontrados pelo ensaio do cometa (TICE et al., 2000). A verificação da porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides é um parâmetro confiável de análise e tem sido utilizada em estudos atuais (LOU et al., 2009; HANSEN et al., 2009; KUPPAN et al., 2009; BUTTON et al., 2009).

Até o momento não há relatos na literatura de outros estudos evidenciando a mutagenicidade e/ou genotoxicidade e antimutagenicidade e/ou antigenotoxicidade do óleo de buriti e nem do fruto do buriti em testes *in vivo* e/ou *in vitro*.

Apesar da ausência de estudos na literatura sobre os efeitos bioativos do óleo de buriti, especificamente sobre a avaliação do seu potencial mutagênico e genotóxico, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, acredita-se que a presença de pigmentos naturais antioxidantes seja responsável pela atividade protetora do óleo de buriti, frente aos danos ao DNA induzidos pela DXR em células sanguíneas, encontrada neste estudo. De acordo com a análise fitoquímica do óleo de buriti, verifica-se alta concentração de carotenóides e também quantidade significativa de tocoferóis, em concordância com estudos descritos na literatura (YUYAMA et al., 1998; GARCIA-QUIROZ et al., 2003; DE ROSSO; MERCADANTE 2007^a; COSTA, 2007; ZANATTA et al., 2010). Mesmo sendo estes pigmentos dotados de atividade antimutagênica e antigenotóxica,

comprovadas em outros estudos descritos na literatura, há necessidade de se conhecer não só a quantidade consumida de cada pigmento, mas também a biodisponibilidade, isto é, a proporção desses nutrientes que é absorvida e metabolizada pelos camundongos.

Os carotenóides são pigmentos naturais de colorações que variam do amarelo ao alaranjado e vermelho, presentes principalmente em frutos e vegetais e também podem ser sintetizados em alguns microrganismos como bactérias, fungos, algas e alguns insetos e animais marinhos (DURING; HARRISON, 2004; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^b). É o pigmento natural mais usado na indústria alimentícia em substituição aos corantes artificiais. Em função da capacidade de capturar espécies radicalares como o oxigênio singlete, os carotenóides são dotados de alta atividade antioxidante (CHEN et al., 2007; ZANATTA et al., 2010). Ainda, são amplamente relatados com importantes funções e ações fisiológicas sendo a atividade provitamina A o efeito bioativo mais conhecido (DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^a). Muitos estudos relatam a importante correlação entre a ingestão de vegetais e frutos contendo carotenóides e prevenção de doenças crônico-degenerativas como câncer, inflamação, doenças cardiovasculares, catarata, degeneração macular, dentre outras (KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003; DURING; HARRISON, 2004; STAHL; SIES, 2007).

Nem todos os carotenóides apresentam atividade provitamina A e, independente desta atividade, os carotenóides, de um modo geral, apresentam diversas funções bioativas que podem reduzir a atividade mutagênica de outros compostos (PHILPOTT, 2008), hipótese que vem sendo amplamente utilizada em estudos atuais *in vivo* e *in vitro* (HOSSEINZADEH et al., 2008; TRIPATHI;

JENA, 2008; BARCELOS et al., 2010; PENG et al., 2010).

É preciso lembrar que cada carotenóide possui um padrão diferente de absorção, distribuição e metabolismo, em função de suas diferenças na estrutura química (PARKER, 1996). A biodisponibilidade de carotenóides ingeridos a partir da dieta varia muito e depende de diversos fatores como a natureza físico-química da matriz alimentar e a sua solubilidade nos ácidos biliares. Inseridos em uma matriz oleosa, a absorção dos carotenóides pelas células da mucosa intestinal é bem maior, aumentando sua biodisponibilidade (OLSON, 1994; PARKER, 1996).

Analisando os resultados encontrados, em alguns parâmetros, observa-se que o óleo de milho demonstrou ação protetora frente aos danos ao DNA induzidos pela DXR, principalmente no tratamento sub-agudo. Porém, observa-se ao mesmo tempo que o óleo de buriti, diluído em óleo de milho diminuiu os danos ao DNA induzidos pela DXR em todos os parâmetros, no entanto, sem diferença estatística significativa. Acredita-se que a associação dos dois óleos tenha aumentado a absorção dos carotenóides presentes no óleo de buriti. De acordo com estudos descritos, a presença concomitante de carotenóides e óleos em alguns frutos amazônicos melhoram consideravelmente a biodisponibilidade oral dos carotenóides (OLSON, 1994; PARKER, 1996; DE ROSSO, MERCADANTE, 2007^a). Ainda, sabe-se que a presença de lipídios é de extrema importância no processo de absorção da vitamina A, atuando como carregadores e também como estimulantes do fluxo biliar (BIELSALSKI, 1997; YUYAMA et al., 1998).

O beta-caroteno, caracterizado no óleo de buriti, é um carotenóide conhecido como principal precursor de vitamina A e também descrito como

potente antioxidante (BURRI, 1997; WANG et al., 2009). Salvadori et al. (1992), observaram o efeito antimutagênico do beta-caroteno nos danos ao DNA induzidos pela ciclofosfamida em camundongos. O beta-caroteno apresenta boa biodisponibilidade em ratos (VARGAS, 2007) e reage diretamente com os radicais livres originados no metabolismo da DXR (QUILES et al. 2002; DIAS et al., 2009; GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010), o que pode estar relacionado com o efeito protetor encontrado neste trabalho.

Em tratamentos associados com a DXR, a vitamina A diminuiu a peroxidação lipídica induzida em células cardíacas, hepáticas e renais de camundongos (QUILES et al., 2006) e também demonstrou efeito protetor em aberrações cromossômicas em células de medula óssea de ratos frente aos danos induzidos pela DXR (GULKAÇ et al., 2004), em concordância com estes resultados.

A biodisponibilidade dos carotenóides do fruto buriti foi determinada em ratos que receberam ração adicionada de farinha de buriti, previamente preparada, identificada e caracterizada. Inicialmente, 8 animais foram usados e coletou-se o sangue e o fígado a fim de avaliar as reservas iniciais de vitamina A em células hepáticas e plasma sanguíneo. Os demais animais receberam a ração de buriti por 28 dias. O buriti revelou-se uma fonte de vitamina A concentrada e altamente biodisponível, com vantagem de possuir alto teor de lipídios, importantes como veículo para a vitamina A (YUYAMA et al., 1998).

Ainda, justificando os efeitos antimutagênicos e antigenotóxicos apresentados pelo óleo de buriti *in vivo*, de acordo com a sua caracterização fitoquímica, é importante ressaltar que, além dos carotenóides, os tocoferóis (vitamina E) também foram identificados e caracterizados no óleo de buriti em

quantidade significativa. Vitaminas antioxidantes inativam os radicais livres gerados pelos vários processos bioquímicos, no metabolismo normal da célula e, em função deste efeito, muitos antioxidantes como as vitaminas C, E e extratos de plantas têm sido testados em modelos animais, diminuindo a mutagenicidade induzida por drogas específicas. Em estudo recente, em delineamento experimental semelhante a este estudo, Singh et al. (2008), observaram o efeito protetor da vitamina E frente aos danos genotóxicos induzidos pelo herbicida atrazina em células sanguíneas e hepáticas de ratos, usando o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa.

A vitamina E tem se mostrado efetiva na redução da genotoxicidade de vários compostos sabidamente genotóxicos, sendo considerado o antioxidante mais promissor na redução de efeitos genotóxicos induzidos por agentes químicos (SINGH et al., 2008). Ratos Wistar tratados simultaneamente com DXR e baixas doses de vitamina E, demonstraram redução no número total de aberrações cromossômicas, o que não aconteceu em doses mais altas, indicando que a proteção aos danos cromossômicos depende da dose administrada (ANTUNES; TAKAHASHI, 1998). Em geral, estudos pré-clínicos em roedores mostraram que a administração oral de vitamina E tende a aumentar a atividade antitumoral e apresenta proteção frente aos efeitos tóxicos da DXR em células cardíacas, hepáticas, renais e epiteliais (KALENDER et al., 2005).

Em resumo, tanto os carotenóides como os tocoferóis são dotados de efeitos bioativos como atividade antioxidante, modulação da função imune, regulação da diferenciação e proliferação celular (GRANADO-LOURENCIO et al., 2006), o que pode estar diretamente relacionado com as atividades

antimutagênica e antígenotóxica do óleo de buriti *in vivo*, observada neste estudo. Este é o primeiro estudo que avalia efeitos bioativos no óleo de buriti. Além de outros estudos de mutagenicidade e antimutagenicidade com o óleo de buriti em diferentes condições experimentais, reforçamos a importância de uma completa investigação do seu potencial antioxidante, informação que pode direcionar novos estudos relacionados aos seus efeitos bioativos.

Estas novas informações, poderão ser aplicadas diretamente no desenvolvimento de produtos alimentares com características funcionais otimizadas, bem como para explorar as características do açaí e do buriti como promotores da saúde.

6. CONCLUSÃO

6. CONCLUSÕES

Foram realizadas, neste estudo, as avaliações das atividades mutagênica/antimutagênica da polpa de açaí e do óleo de buriti em células de medula óssea, sangue periférico, renais e hepáticas de camundongos Swiss tratados com o antitumoral doxorubicina, em dois protocolos distintos, sendo um agudo e outro sub-agudo. Nas doses testadas e nestas condições experimentais:

- A polpa de açaí e o óleo de buriti não foram genotóxicos e nem mutagênicos em células de medula óssea, sangue periférico, fígado e rim de camundongos pelo teste do micronúcleo e ensaio cometa;
- A polpa de açaí inibiu os danos ao DNA induzidos pelo agente antitumoral DXR em todos os órgão e parâmetros testados;
- Nas três doses testadas o óleo de buriti inibiu os danos ao DNA induzidos pela DXR em células sanguíneas pelo teste do micronúcleo no tratamento agudo e sub-agudo e pelo teste do cometa no tratamento sub-agudo;

Em conclusão, a polpa de açaí e o óleo de buriti demonstraram atividade antimutagênica em camundongos Swiss. No entanto, sugere-se a realização de outros estudos toxicológicos em condições diferentes, até que se tenham dados consistentes e seguros para explorar o seu uso na indústria alimentícia, farmacêutica, cosmética, dentre outras, em ações voltadas para a promoção á saúde humana e também em futuras estratégias de prevenção em tratamentos clínicos em associação com a DXR.

7. REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

ABRANTES, S.; AMORIM, J.R.; OLIVEIRA, S.M.; BASTOS, P.A.; NERY, V.V.C.; BAZILIO, F.S. Avaliação de corantes artificiais em bebidas não alcoólicas e não gaseificadas. **Revista Analytica**, São Paulo, v.27, p. 30-33, 2007.

ACEVEDO, H.R.; ROJAS, M.D.; ARCEO ; S.D..B.; HERNÁNDEZ, M.S.; VÁZQUEZ, M.M.; TERRAZAS, T.; DEL-TORO, G.V. Effect of 6-nonadecyl salicylic acid and its methyl ester on the induction of micronuclei in polychromatic erythrocytes in mouse peripheral blood. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 609, p. 43–46, 2006.

ADETUTU, A.; ODULON, O.A.; OWOADE, O.A.; ADELEKE, O. A.; AMUDA, O.S. Anticlastogenic effects of Hibiscus sabdariffa fruits against sodium arsenite-induced micronuclei formation in erythrocytes in mouse bone marrow. **Phytotherapy Research**, Hoboken, v. 18, p. 862-864, 2004.

ALBUQUERQUE, M.L.S.; GUEDES, I.; ALCANTARA, J.; MOREIRA, S.G.C.; BARBOSA NETO, N.M.; CORREA, D.; ZILLO, S.C. Characterization of buriti (*Mauritia flexuosa* L.) oil by absorption and emission spectroscopies. **Journal of Brazilian Chemistry Society**, Campinas, v. 16, p. 1113-1117, 2005.

ALMEIDA, M.R.; LIMA, E.O.; SILVA, V.J.D.; CAMPOS, M.G.; ANTUNES, L.M.G.; SALMAN, A.K.D.; DIAS, F.L. Genotoxic studies in hypertensive and normotensive rats treated with amiodarone. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 657, p.155-159, 2008.

ÁLVAREZ-GONZÁLEZ, I.; MADRIGAL-BUJADAR, E.; MARTINO-ROARO, L.; ESPINOSA-AGUIRRE, L. Antigenotoxic and antioxidant effect of grapefruit juice in mice treated with daunorubicin. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 152, 2004.

AMARA-MOKRANE, Y.A.; LEBUCHER-MICHEL, M.P.; BALANSARD, G.; DUMÉNIL, G.; BOTTA, B. Protective effects of α -heredin, chlorophyllin and ascorbic acid towards the induction of micronuclei by doxorubicin in cultured human lymphocytes. **Mutagenesis**, Oxford, p.161-167, 1996.

Amazonview [homepage na internet] Belém do Pará. Disponível em <http://amazonview.uol.com.br/> 12. Acesso em 14/05/2009.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.350, p.103-108, 1996.

ANDRADE JÚNIOR, D.R.; SOUZA, R.B.; SANTOS, S.A.; ANDRADE, D.R. Os radicais livres de oxigênio e as doenças pulmonares. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, Brasília, v. 31, p. 60-68. 2005.

ANDREADOU, I.; SIGALA, F.; ILIODROMITS, E.K.; PAPAEFTHIMOU, M.; SIGALAS, C.; ALIGIANNIS, N.; SAVVARI, P.; GORGOU LIS, V.; PAPALABROS, E.; KREMASTINOS, D.T.; Acute doxorubicin cardiotoxicity is successfully treated with the phytochemical oleuropein through suppression of oxidative and nitrosative stress. **Journal of Molecular and Cellular Cardiology**, Manchester, v. 42, p. 549-558.

ANTUNES L.M.G.; TAKAHASH, C.S. Effects of high dose of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 43, p. 419-137, 1998.

ANTUNES L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, p. 81-88, 2000.

ANTUNES L.M.G.; PASCOAL L.M.; BIANCHI M.L.P.; DIAS F.L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocytes cultures. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 585, 2005.

ANTUNES L.M.G.; BUENO, R.B.L.; DIAS, F. L.; BIANCHI, M.L.P. Acetylsalicylic acid exhibits anticlastogenic effects on cultured human lymphocytes exposed to doxorubicin. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 626, p. 155–161, 2007.

ANVISA, RE nº90, Guia para a realização de estudos de toxicidade pré-clínica de fitoterápicos, 16 de março de 2004.

AOCS, Official Methods and Recommended Practices of the American Oil Chemist's Society. 5 ed. AOCS Press, Champaign, 2004.

ARUOMA, O.I. Methodological considerations for characterizing potential antioxidant actions of bioactive components in plant foods. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 523, p.9-20, 2003.

AUST, H.; SIES, H. STHAL, W.; POLIDORI, M.C. Analysis of lipophilic antioxidants in human serum and tissues: tocopherols and carotenoids. **Journal of Chromatography**, Amsterdam, v. 936, p.83-93, 2001.

AZEVEDO, L.; ALVES, L. P.L.; GOMES, J.C.; STRINGHETA, P.C.; RIBEIRO, D.A.; SALVADORI, D.M. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) *in vivo*. **Food Chemical Toxicology**, New York, v. 45, p.852-858, 2006.

BACK, S., ENZELL, C.R. Mass Spectrometry. In: Carotenoids Spectroscopy. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. (Eds.). Birkhäuser, Basel, v. 1, p.261-320, 1995.

BARCELOS, G.R.; ANGELI, J.P.; SERPELONI, J.M.; ROCHA, B.A.; MANTOVANI, M.S.; ANTUNES, L.M. Effect of annatto on micronuclei induction

by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.50, p.808-814, 2009.

BEILLEROT, A.; DOMINGUEZ, J.C.; KIRSCH, G.; BAGREL, D. Synthesis and protective effects of coumarin derivatives against oxidative stress induced by doxorubicin. **Bioorganic Medicinal Chemistry Letters**, Oxford, v.18, p. 1102-1105, 2008.

BIELSALSKI, H.K. Bioavailability of vitamin A. **European Journal of Clinical Nutrition**, London, v.51; p.S71-S75, 1997.

BIANCHI, M.L.P.; ANTUNES, L.M.G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 2, p. 123-130, 1999.

BLUM, K.A.; JUNG, S.H.; JOHNSON, L.; LIN, T.S.; HIS, E.D.; LUCAS, D.M.; BYRD, J.C.; CHESON, B.D.; BARTLETT, N.L. Serious pulmonary toxicity in patients with Hodgkin's lymphoma with SGN-30, gemcitabine, vinorebine, and liposomal doxorubicin is associated with na FcR11a-158 v/f polymorphism. **Annals of Oncology**, Dordrecht, 2010. In press.

BRIEN, J.F.; JIMMO, S.; BRENNAN, F.J.; FORD, S.E.; ARMSTRONG, P.W. Distribution of amiodarone and its metabolite, desethylamiodarone, in human tissues. **Journal of Physiology and Pharmacology**, Winnipeg, v. 65, p. 360-364, 1987.

BRITTON, G. UV/visible spectroscopy. In: Carotenoids, Vol. 1B: Spectroscopy. Britton, G.; Liaaen-Jensen, S.; Pfander, H. Birkhäuser, Basel, p.13-62, 1995.

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

BUENO, A.M.S.; AGOSTINI, J.M.S. Estabelecimento de um controle histórico da frequência de eritrócitos micronucleados em camundongos da linhagem Swiss, do biotério central da UFSC. [relatório de pesquisa]. Florianópolis. Universidade Federal de Santa Catarina, 2001.

BUENO, A.M.S.; PEREIRA, C.A.B.; RABELO-GAY, N. Environmental genotoxicity evaluation using cytogenetic end points in wild rodents. **Environmental Health Perspectives**, Triangle Park, v.18, p.1165-1169, 2000.

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

BURRI, J.B. Beta-carotene and human health: a review of current research. **Nutrition Research**, New York, v.17, p.547-580, 1997.

BUTTON, M.; JENKIN, G.R.; BOWMAN, K.J.; HARRINGTON, C.F.; BREWER, T.S.; JONES, G.D.; WATTS, M.J. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the Comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 696, p.95-100. 2009.

CAINELLI, F.; VALLONE, A. Safety and efficacy of pegylated liposomal doxorubicin in HIV-associated Kaposi's sarcoma. **Biologics: Targets & Therapy**, Botswana, v.3, p. 385-390, 2009.

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

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

CHAN, A.C. A cocktail approach to antioxidant therapy. **Nutrition Research**, Philadelphia, v. 16, p. 1098-1099, 2000.

CHEN, J.; JARVI, M.; LO, P.C.; STEFFLOVA, K.; WILSON, B.C.; ZENGH, G. Using the singlet oxygen scavenging property of carotenoid in photodynamic molecular beacons to minimize photodamage to non-derived cell lines. **Photochemical and Photobiological Sciences**, Cambridge, v.6, p.1311-1317, 2007.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v.28, p. 11-23, 2007.

COISSON, J.D.; TRAVAGLIA, F.; PIANA, G.; CAPASSO, M.; ARLORIO, M. *Euterpe oleracea* juice as a functional pigment for yogurt. **Food Research International**, Oxford, v. 38, p. 893-897, 2005.

COLLINS, A.R. AI-GUO, M. ; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 336, p. 69-77, 1995.

COLLINS, A.R. Carotenoids and genomic stability. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 475, p.21-28, 2001.

COLLINS, A.R.; OSCOZ, A.A.; BRUNBORG, G.; GAIVÃO,I.; GIOVANNELLI, L.; KRUSZEWSKI, M.; SMITH, C.; STETINA, R. The comet assay: topical issues. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, p. 143–151, 2008,

CÓRDOVA-FRAGA,T.; ARAÚJO, D..B.; SANCHEZ, T.A.; ELIAS, J.; CARNEIRO, A.A.O.; BANDT-OLIVEIRA, R. SOSA, M., BAFFA, O. *Euterpe oleracea* (Açaí) as an alternative oral contrast agent in MRI of the

gastrointestinal system: preliminary results. **Magnetic Resonance Imaging**, New York, v. 22, p. 389-393, 2004.

COSTA, L.A.L.; TEIXEIRA, V.N.; SCHNEIDER, A. Comparative study of the possible protective effect of vitamin E in a model of lung injury with doxorubicin in rats. **Revista Brasileira de Cirurgia**, São José do Rio Preto, v. 31, p. 235-256, 2004.

COSTA, P.A. Caracterização de ácidos graxos, tocoferóis e fitosteróis em frutas e castanhas das regiões norte e nordeste do Brasil. 2007 [tese de doutorado], 102 p. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2007.

DA SILVA, J.; FREITAS, T.R.O.; MARINHO, J.R.; SPEIT, G.; ERDTMANN, B. An alkali single-cell gel eletroforesis (comet) assay for environmental biomonitoring with native rodents. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 23, p. 241-245, 2000.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments, T.W. Goodwin. **Academic Press**, London, v. 2, p. 38-165, 1976.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. Identification and quantification of carotenoids by HPLC-PDA-MS/MS, from amazonian fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 5062-5072, 2007^a.

DE ROSSO, V.V.; MERCADANTE, A.Z. HPLC-PDA-MS/MS of anthocyanins and carotenoids from dovyalis and tamarillo fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, p. 9135-941, 2007^b.

DE SOUZA, M.O.; SILVA, M.; SILVA, M.E.; OLIVEIRA, R. DE P.; PEDROSA M.L. Diet supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profile in rats. **Nutrition**, Burbank, v.26, p.804-810, 2010.

DEEPA, P.R.; VARALAKSHMI, P. Influence of a low-molecular-weight heparin derivative on the nitric oxide levels and apoptotic DNA damage in adriamycin-induced cardiac renal toxicity. **Toxicology**, New York, v.217, p.176-83, 2006.

DEL POZO-INSFRAN, D.; PERCIVAL, S.; TALCOTT, S. Açai (*Euterpe oleracea* Mart.) polyphenolics in their glycoside and aglycone forms induce apoptosis of HL-60 leukemia cells. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p.1222-1229, 2006.

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

DIAS, C.D.; ARAÚJO, B.C.; DUTRA, E.S.; NEPOMUCENO, J.C. Protective effects of β -carotene against the genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of

Drosophila melanogaster. **Genetic and Molecular Research**, Ribeirao Preto, v.8, p.1367-1375, 2009.

DIVISI, D.; DI TOMASSO, S.; SALVEMINI, S.; GARRAMONE, M.; CRISCI, R. Diet and cancer. **Acta Biomedica**, Parma, v. 77, p. 118-123, 2006.

DURING, A.; HARRISON, E.H. Intestinal absorption and metabolism of carotenoids: insights from cell culture. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v.430, p.77-88, 2004.

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

FERGUSON, L.R. Role of plant polyphenols in genomic stability. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 475, p. 89–111, 2001.

FERGUSON, L.R.; PHILPOTT, M. Nutrition and mutagenesis. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 28, p.313–329, 2008.

FERREIRA, A.L.A.; MATSUBARA, I.S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 43, p. 61-68, 1997.

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

FERREIRA, A.L.A.; YEN, K.; MATSUBARA, L.S.; MATSUBARA, B.B.; CORREA, C.R.; PEREIRA, E.J.; RUSSEL, R.M.; KRINSKY, N.I.; TANG, G. Doxorubicin as an antioxidant:maintenance of myocardial levels of lycopene under doxorubicin treatment. **Free Radical Biology & Medicine**, New York, v. 43, p.740-751, 2007.

FRANÇA, L.F.; REBER, G.; MEIRELES, M.A.; MACHADO, N.T.; BRUNNER, G. Supercritical extraction of carotenoids and lipids from buriti (*Mauritia flexuosa*), a fruit from the Amazon region. **Journal of Supercritical Fluids**, Amsterdam, v. 14, p. 247-256, 1999.

FURTADO, M.A.; ALMEIDA, L.C.F.; FURTADO, R.A.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 657, p. 150-154, 2008.

GARCIA-QUIROZ, A.; MOREIRA, S.G.C.; DE MORAIS, A.V.; SILVA, A.S.; DA ROCHA, G.N.; ALCANTARA, P. Physical and chemical analysis of dielectric

properties and differential scanning calorimetry techniques on buriti oil. **Instrumental Science and Technology**, Philadelphia , v. 31, p.93-101, 2003.

GASIOROWSKI, K.; SZYBA, K.; BROKOS, B.; KOLACZYLSKA, B.; JANKOWIAK-WLODARCZYK, M.; OSZMIAFISKI, J. Antimutagenic activity of anthocyanins isolated from *Aronia melanocarpa* fruits. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 119, p. 37-46, 2001.

GOETHEM, V.F.; LISON, D.; KIRSCH-VOLDERS, M. Comparative evaluation of the in vitro micronucleus test and the alkaline single gel electrophoresis assay for the detection of DNA damaging agents: genotoxic effects of cobalt powder, tungsten carbide and cobalt-tungsten carbide. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 392, p. 31-43, 1997.

GOKHALE, M.S.; LIN, J.R.; YAGER, J.D. A mixture of antioxidants and fatty acids improves the viability of cultures rat hepatocytes untreated or treated with doxorubicin. **Toxicology In Vitro**, New York, v.11, p.753-759, 1997.

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

GRANADOS-PRINCIPAL, S.; QUILES, J.L.; RAMIREZ-TORTOSA, C.; SANCHEZ-ROVIRA, P.; RAMIREZ-TORTOSA, M. C. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, New York, 2010. In press. Disponível em: Acesso em 24/05/2010.

GRANADO-LOURENCIO, F.; OLMEDILLA-ALONSO, B.; HERRERA-BARBUDO, C.; BLANCO-NAVARRO, I.; PÉREZ-SACRISTÁN, B.; BLÁZQUEZ-GARCIA, S. *In vitro* bioaccessibility of carotenoids and tocopherols from fruits and vegetables. **Food Chemistry**, Barking, v.102, p.641-648, 2007.

GÜLKAÇ MD, AKPINAR G, USTÜN H, OZÖN KANLI A. Effects of vitamin A on doxorubicin-induced chromosomal aberrations in bone marrow cells of rats. **Mutagenesis**, Oxford, v.19, p-231-236, 2004.

HAGIWARA, A.; MIYASHITA, K.; NAKANISHI, T.; SANO, M.; TAMANO, S.; KADOTA, T.; KODAC, T.; NAKAMURA, M.; IMAIDA, K.; ITO, N.; SHIRAI, T. Pronounced inhibition by a natural anthocyanin, purple corn color, of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5-b]pyridine (PhIP)-associated colorectal carcinogenesis in male F344 rats pretreated with 1,2-dimethylhydrazine. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.171, p. 17-25, 2001.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J.M.C. Role of free radicals and catalytic metal ions in human disease: an overview. **Methods Enzymology**, New York, p.185-186, 1990.

HALLIWELL, B.; LEE, C.Y. Using isoprostanes as biomarkers of oxidative stress: some rarely considered issues. **Antioxidant and Redox Signaling**, New York, v. 15, p. 145-156, 2010.

HANSEN, S.H.; OLSEN, A.K.; SODERLUND, E.J.; BRUNBORG, G. In vitro investigations of glycidamide-induced DNA lesions in mouse male germ cells and in mouse and human lymphocytes. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 696, p.55-61, 2009.

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

HAYASHI, M.; The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 278, p. 209-213, 1992.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; Gatehouse , D.G. ; BLAKEY, D.H.; Dertinger, S.D.; Abramsson-Zetterberg, L.; Krishna, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; ASANO, N.; SUZUKI, H.; OHYAMAL, W.; GIBSON, D. *In vivo* erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 627, p. 10-30, 2007.

HOELZL, C; KNASMULLER, S.; MISIK, M.; COLLINS, A.; DUSINSKA, 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, p. 68–79, 2009.

HOSSEINZADEH, H.; ABOOTORABI, A.; SADEGHNIA, H.R. Protective effect of *Crocus sativus* stigma extract and crocin (trans-crocin 4) on methyl methanesulfonate-induced DNA damage in mice organs. **DNA and Cell Biology**, New York, v.27, p.657-64, 2010.

HOYT, R. JR; HAWKINS, J. V.; St CLAIR, M.B.; KENNET, J.M. The mouse physiology. in biomedical research. Academic press, 2ed, p. 23-90, 352p. 2007.

HURSTING , S.D.; NUNEZ , N.; PATEL, A.; PERKINS, S.N.; LUBET, R.; BARRETT, J.C. The utility of genetically altered mouse models for nutrition and cancer chemoprevention research. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 576, p. 80-92, 2005.

ISLAH, M.; HALSTEAD, B.W.; KADURA, I.A.; LI, B.,REID-HUBBARD, J.L.; FLICK, L.; ALTIZER, J.L.; DEAHL, J.T.; MONTEITH, D.K.; NEWTON, R.K. ; WATSON, D.E. Relationships between genomic, cell cycle, and mutagenic responses of TK6 cells exposed to DNA damaging chemicals. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 578, p.100–116, 2005.

JESUS, N.S.; SOUZA , E.M. ; SILVA , E.M.; LOIRA, A.; REES, J.F.; ROGEZ, H.; LARONDELLE Y. Antioxidant capacity of four polyphenol-rich amazonian plant extracts: a correlation study using chemical and biological *in vitro* assays. **Food Chemistry**, Barking, v. 106, p. 3331-339, 2008.

JONFIA-ESSIEN, W.A.; WEST, G.; ALDERSON, P.G.T. Phenolic content and antioxidant capacity of hybrid variety cocoa beans. **Food Chemistry**, Barking , v.108, p. 1155-1159, 2008.

KEIZER , H.G.; PINEDO, H.M.; SCHUURHUIS, G.J.; . JOENJE, H. Doxorubicin (Adriamycin): a critical review of free radical-dependent mechanisms of cytotoxicity. **Pharmacology & Therapeutics**, Oxford, v. 47, p.279-231, 1990.

KHAYAT, T. C.; COSTA, E.A.S. Comportamento do risco para doença aterosclerótica coronária na população de Inhangapi. **Revista Científica da UFPA**, Belém do Pará, v.5, p. 113, 2006.

KAHYAT T. Comportamento do risco para doença aterosclerótica conorária na população de Inhangapi cuja base alimentar é o fruto do açaí (*Euterpe oleracea*). 2005 [trabalho de conclusão de curso], 69 p. Belém do Pará: Universidade Federal do Pará. Curso de Medicina, Departamento de Clínica Médica, 2005.

KALENDER, Y YELB M.; KALENDER, S. Doxorubicin hepatotoxicity and hepatic free radical metabolism in rats:The effects of vitamin E and catechin. **Toxicology**, Amsterdam ,v. 209, p. 39-45, 2005.

KAPADIA, G.J.; BALASUBRAMANIAN, V.; TOKUDAB H.; IWASHIMAB, A.; NISHINOB, H. Inhibition of 12-O-tetradecanoylphorbol- 13-acetate induced Epstein-Barr virus early antigen activation by natural colorants. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 115, p. 173-178, 1997.

KONG, J.M.;CHIA, L.S.; GOH, N.K.; CHIA, T.F.; BROUILLARD, R. Analysis and biological activities of anthocyanins. **Phytochemistry**, New York, v. 64, p. 923-933, 2003.

KONCZAK-ISLAM, YOSHIMOTO, M.; HOU, D.X.; TERAHARA, N.; YAMAKAWA, O. Potential chemopreventive proprieties of anthocyanin-rich aqueous extracts from *in vitro* produced tissue of sweetpotato (*Ipomoea batatas* L.). **Journal of Agriculture and Food Chemical**, Whashington, v. 51, p. 5916-5922, 2003.

KRINSKY, N. I.; LANDRUM, J. T.; BONE, R. A. Biologic mechanisms of the protective role of lutein and zeaxanthin in the eye. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 23, p.171–201, 2003.

KUPPAN, G.; BALASUBRAMANYAM, J.; MONICKARAJ, F.; SRINIVASAN, G.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. **Cytokine**, San Diego, v. 49, p.229-34, 2009.

KUSHWAHA, S.; TRIPHATHi, D.N.; VIKRAM, A.; RAMARAO, P.; JENA, G.B. Evaluation of multi-organ DNA damage by comet assay from 28 days repeated dose oral toxicity test in mice: a practical approach for test integration in

regulatory toxicity testing. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, Bethesda, v. 58, p.145-154, 2010.

LEE, H.J.; LEE, W.K. The roles of polyphenols in cancer chemoprevention. **Biofactors**, Oxford, v. 26, p. 105-121, 2006.

LEWIS, E.M.S.; AGBAJE, I.M. Using the alkaline comet assay in prognostic tests for male infertility and assisted reproductive technology outcomes. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, p. 163-170, 2008.

LILA, M.A. Plant pigments and human health. **Trends Food Sciencies Technology**, Oxford, v.16, p 370-376, 2004.

LOPEZ-MARTINEZ, L.X., OLIART-ROS, R.M., VALERIO-ALFARO, G., CHEN-HSIEN L., PARKIN, K.L., GARCIA, H.S. Antioxidant activity, phenolic compounds and anthocyanins content of eighteen strains of Mexican maize. **Food Sciencies Technology**, v.42, p.1187-1192, 2009.

LOU, J.; ZHOU, G.; CHU, G.; JIANG, J.; HUANG, F.; ZHENG, S.; LU, Y.; LI, X.; HE, J. Studying the cyto-genotoxic effects of 12 cigarette smoke condensates on human lymphoblastoid cell line *in vitro*. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 679, p. 48-54. 2009.

LOWELL, D.P.; OMORI, T. Statistical issues in the use of the comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, p. 171–182, 2008.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TIA, R.R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocyte. **Mutation Research**, Amsterdam, v.189, p.103–112, 1987.

MADHYASTHA, S.; PRABHU, L.V.; SARALAYA, V.; RAI, R. A comparison of vitamin A and leucovorin for the prevention of metotrexate-induced micronuclei production in rat bone marrow. **Clinics**, São Paulo, v.63, p. 821-826, 2008.

MAISTRO, E.L.; CARVALHO, J.T.C.; MANTOVANI, M.S. Evaluation of genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicology In Vitro**, New York, v. 18, p. 337-342, 2004.

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

MARÍN-MARTINEZ, R. B., VELOZ-GARCÍA, R. B., VELOZ-RODRÍGUEZ, R. B.; GUZMÁN-MALDONADO, S. H. C.; LOARCA-PINA, G. D.; CARDADOR-MARTINEZ, A.D.E.; GUEVARA-OLIVERA, L.B, MIRANDA-LÓPEZ, R.B.; TORRES-PACHECO, I.A.; PÉREZ, C. B.; HERRERA-HERNÁNDEZ, G.B.C.; VILLASEÑOR-ORTEGA, F. B. ; GONZÁLEZ-CHAVIRA, M. C., GUEVARA-GONZALEZ, R. G. Antimutagenic and antioxidant activities of quebracho

phenolics (*Schinopsis balansae*) recovered from tannery wastewaters. **Bioresource Technology**, New York, v. 100, p.434-439, 2009.

MATHEUS, M.E.; OLIVEIRA, S.B.; SILVEIRA, C.S.; RODRIGUES, V.P., MENEZES, F.S.; FERNANDES, P.D. Inhibitory effects of *Euterpe oleracea* Mart. on nitric oxide production and iNOS expression. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 107, p. 291–296, 2006.

MAVOURNIN, K.H.; BLAKEY, D.H.; CIMINO, M.C. The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v.239, p.29-80,1990.

MERTENS-TALCOTT, S.U.; RIOS, J.; JILMA-STOHLAWETZ, P.J. , PACHECO-PALENCIA, L.A. MEIBOHM, B., TALCOTT, S.T., DERENDORF, H. Pharmacokinetics of anthocyanins and antioxidant effects after the consumption of anthocyanin-rich açai juice and pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) in human healthy volunteers. **Journal of Agriculture Food Chemistry**, Whashington, v. 56, p. 7796-7802, 2008.

MINOTTI, G., MENNA, P., SALVATORELLI, E., CAIRO, G., GIANNI, L. Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacology Research**, London, v. 56, p.185–229, 2004.

MURRIETA, R. S. S.; DUFOR, D.L.; SIQUEIRA, A.D. Food consumption and subsistence in three caboclo populations on Marajó Island, Amazonia, Brazil. **Human Ecology**, New York, v. 27, 1999.

NANDAKUMAR, V.; SINGH, T.; KATIYAR, S.K. Multi-targeted prevention and therapy of cancer by proanthocyanidins. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 269, p. 378-387, 2008.

NEBEL, M.C.; LARRIPA, I.; GONZÁLEZ-CID, M. Differential antigenotoxic and cytoprotective effect of aminofostine in idarubicin-treated mice. **Environmental Molecular Mutagenesis**, v. 39, p.3-9, 2002.

NESSLANY, F.; ZENNOUCHE, N.; SIMAR-MEINTIÉRES, S.; TALAHARI, I., NKILI-MBOU, N. ; MARZIN, D. *In vivo* comet assay on isolated kidney cells to distinguish genotoxic and carcinogens from epigenetic carcinogens or cytotoxic compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 630, p. 28-41, 2007

OLIVEIRA, R. J.; BAISE, E.; MAURO, M. O.; PESARINI, J. R.; MATUO, R.; SILVA, A. F.; RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S. Evaluation of chemopreventive activity of glutamine by the comet and the micronucleus assay in mice's peripheral blood. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, New York, v. 28, p. 120-124, 2009.

OLSON, J.A. Biological actions of carotenoids. **Journal of Nutrition**, Philadelphia, v. 119, p. 94-95, 1994.

OIANES, Z.; ABID, S.; AYED, I.; ANANE, R.; MOBIO, T.; CREPPY, E.E.; BACHA, H. Induction of micronuclei by zearalenone in vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of vitamin E. **Mutation Research**, Amsterdam, v.538, p.63-70, 2003.

PACHECO-PALENCIA, L.A., HAWKEN, P., TALCOTT, S.T. Juice matrix composition and ascorbic acid fortification effects on the phytochemical, antioxidant and pigment stability of açai (*Euterpe oleracea* Mart). **Food Chemistry**, Barking, v. 105, p. 28-35, 2007.

PAI V. B.; NAHATA, N.C. Cardiotoxicity of chemotherapeutic agents: incidence, treatment and prevention. **Drug Safety**, Auckland, v. 22, p. 263-302, 2000.

PARK, S.S.; KIM, A.E.; EOMY.W.; CHO, K.S. Bcl-xL blocks high dose doxorubicin-induced apoptosis but not low dose doxorubicin-induced cell death through mitotic catastrophe. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 363, p.1044–1049, 2007.

PARKER, R.S. Carotenoids, absorption, transport and metabolism of carotenoids. **FASEB Journal**, Bethesda, v.10, p. 542-551, 1996.

PASSOS, M.A.B.; MENDONÇA, M.S. Epiderme dos segmentos foliares de *Mauritia flexuosa* L. f. (*Arecaceae*) em três fases de desenvolvimento. **Acta Amazonica**, Manaus, v. 36, p. 432-438, 2006.

PATEL, N.; JOSEPH, C.; CORCOAN, B.G.; RAY, S.D. Sylmarin modulates doxorubicin-induced oxidative stress, Bcl-xL and p53 expression while preventing apoptotic and necrotic cell death in the liver. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v.254, p.143-152, 2010.

PENG, C.H.; CHIU, W.T.; JUAN, C.W., CHEN, C.C.; LAI, E.Y., CHYAU, C.C. Pivotal role of curcuminoids on the antimutagenic activity of *Curcuma zedoaria* extracts. **Drug and Chemical Toxicology**, New York, v. 33, p.64-76, 2010.

PEREIRA, A.D.; ANDRADE, S.F.; SWERTS, M.S.O; MAISTRO, E.L. First *in vivo* evaluation of the mutagenic effect of Brazilian green propolis by comet assay and micronucleus test. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 2580-2584, 2008.

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

PLOTKIN, J. N.; BALICK M. Medicinal uses of south american palms. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 10, p. 157-179, 1984.

POUL, M.; JARRY, G.; ELKIM, M.O.; POUL, J.M. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 47, p. 443–448, 2009.

POULSEN, H.E., PRIEME, H., LOFT, S. Role of oxidative DNA damage in cancer initiation and promotion. **European journal of cancer prevention**, Oxford, v.7, n.1, p.9-16, 1998.

PRAHALATHAN, C.; SELVAKUMAR, E. ; VARALASHMI, P; KUMARASAMY, P; SARAVANAN, R. Salubrious effects of lipoic acid against adriamycin-induced clastogenesis and apoptosis in Wistar rat bone marrow cells. **Toxicology**, Amsterdam, v. 222, p. 225-232, 2006.

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

QUILES JL, HUERTAS JR, BATTINO M, MATAIX J. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, Amsterdam, v.180, p. 79-95, 2002.

QUILES, J.L.; OCHOA, J.J.; RAMIREZ-TORTOSA, M.C.; HUERTAS, J.R. MATAIX, J. Age-related mitochondrial DNA deletion in rat liver depends on dietary fat unsaturation. **Journals of Gerontology**, Washington, v.61, p.107-114, 2006.

RABELO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MOMTELEONE-NETO, R. Mutagênese, Teratogênese e Carcinogênese. **Sociedade Brasileira de Genética**, Ribeirão Preto, 246 p., 1991.

RECIO, L.; HOOBS, C.; CASPARY, W.; WITTE, K.L. Dose response assessment of four genotoxic chemicals in a combined mouse and rat micronucleus (MN) and comet assay protocol. **The Journal of Toxicological Sciences**, Sendai, v. 35, p 149-162, 2010.

REZENDE, F.A.; ALVES, J.M.; MUNARI, C.C.; SENEDESE, J.M.; SOUSA, J.P. B.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D. C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation Research**, Amsterdam, n. 634, p. 112–118, 2007.

RIBEIRO, J.C., ANDRADE, S.F., BASTOS, J.K.; MAISTRO, E.L. Evaluation of the genotoxic potential of *Austroplenckia populnea* (Reiss) Lundell chloroform fraction from barkwood extract in rodent cells *in vivo*. **Brazilian Journal of Biology**, São Carlos, v. 69, p.1141-1147, 2009.

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

RIBEIRO, L. M.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese Ambiental. Canoas: Ed. ULBRA, 356p. 2003.

ROCHA, A.P.M.; CARVALHO, L.C.R.M.; SOUSA, M.A.V.; MADEIRA, S.V.F.; SOUSA, P.J.C.; TANO, T.; SCHINI-KERTH, V.B.; RESENDE, A.C.; SOARES DE MOURA, R. Endothelium-dependent vasodilator effect of *Euterpe oleracea* Mart (Açaí) extracts in mesenteric vascular bed of rat. **Vascular Pharmacology**, New York, v. 46, p. 97-104, 2007.

ROCHA- GUZMÁN, N.E.; HERZOG, A.G.; IBARRA, P.F.J.; ZAMBRANO, G.G.; GALLEGOS, I.J.A. Antioxidant and antimutagenic activity of phenolic compounds in three different colour groups of common bean cultivars. **Food Chemistry**, Barking, v. 103, p. 521-527, 2007.

RODRIGUES, R.B.; LICHTENTHALER, R.; ZIMMERMANN, B.F.; PAPAGIANNOPOULOS, M.; FABRICIUS, H.; MARX, F.; MAIA, J.G.S.; ALMEIDA, O. Total oxidant scavenging capacity of *Euterpe oleracea* Mart. (Açaí) seeds and identification of their polyphenolic compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 54, p. 4162-4167, 2006.

RODRIGUES, C. R. F.; DIAS, J. H.; MELLO, R. N.; RICHTER, N. F.; PICADA, J. N.; FERRAZ, A. B. F. Genotoxic and antigenotoxic properties of *Baccharis trimera* in mice. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 125, p. 97-101, 2009.

ROGEZ, H. Açaí: Preparo, composição e melhoramento da conservação. 2000 [tese de PhD], 360 p. Belém do Pará: Universidade Federal do Pará. Departamento de Engenharia Química, 2000.

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

RUFINO, M.S.M.; FERNANDES, A.N.F.; ALVES, R.E.; BRITO, E.S. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. **Food Chemistry**, Barking, v. 114, p. 693-695, 2009.

SALVADORI, D. M.; RIBEIRO, L. R.; OLIVEIRA, M. D.; PEREIRA, C. A. ; Beçak, W. The protective effect of beta-carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 265, p. 237-244, 1992.

SANTOS, R.A.; JORDÃO JR, A.A.; VANNUCCHI H.; TAKAHASHI, C.S. Protection of doxorubicin-induced DNA damage by sodium selenite and selenomethionine in wistar rats. **Nutrition Research**, Philadelphia, v. 27, p. 343-348, 2007.

SARAIVA, S.A.; CABRAL, E.C.; EBERLIN, M.N.; CATHARINO, R.R. Amazonian vegetable oils and fats: fast typification and quality control via triacylglycerol (TAG) profiles from dry matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight (MALDI-TOF) mass spectrometry fingerprinting. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 57, 4030-4034, 2009.

SCHAUSS, A.G.; WU, X.; PRIOR, R. L.; OU, B.; PATEL, D.; HUANG, D.; KABABICK, J. P. Phytochemical and nutrient composition of the freeze-dried amazonian palm berry, *Euterpe oleraceae* Mart. (Açaí). **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 54, n. 22, 2006.

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

SERPELONI, J.M. Avaliação *in vivo* e *in vitro* da citotoxicidade, genotoxicidade e dos efeitos protetores de extratos de plantas medicinais do cerrado brasileiro 2008. [dissertação de mestrado], 120 p. Londrina: Universidade Estadual de Londrina, 2008.

SERPELONI, J.M.; BARCELOS, G.R.M.; MORI, M.P.; YANAGUI, K.; VILEGAS, V.; VARANDA, E.A.; CÓLLUS, I.M.S. Cytotoxic and mutagenic evaluation of extracts from plant species of the Miconiagenus and their influence on doxorubicin-induced mutagenicity: **Experimental and toxicologic pathology**. Hannover, 2010. In press. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>. Acesso em 29/05/2010.

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, p.184-191, 1988.

SINGH, M.; KAUR, P.; SANDHIR, R.; KIRAN, R. Protective effects of vitamin E against antrazine-induced genotoxicity in rats. **Mutation Research**, Amsterdam, v.654, p.145-149, 2008.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.62, p.1315-1321, 1995.

SILVA, E.M.; SOUZA, J.N.S.; ROGEEZ, H.; REES, J.F.; Larondelle Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, p.1012-1018, 2007.

SINGLETON, V.L.; ROSSI, J.A.JR. Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. **American Journal of Enology and Viticulture**, Davis, v.16, p.144-158, 1965.

SMITH, C.; ADKINS, D.J.; MARTIN, E.A.; O'DONOVAN, M.R. Recommendations for design of the rat comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 23, p. 233-240, 2008.

SOUZA, J.N. S., SILVA, E.M., SILVA, M.N. Identification and antioxidant activity of several flavonoids of *Inga edulis* leaves. **Journal Brazilian Chemistry Society**, Campinas, v.18, p 1276-1280, 2007.

SOUZA, M.O.; SILVA, M.; SILVA, M.E.; OLIVEIRA, R.P.; PEDROSA, M.L. Diet supplementation with açai (*Euterpe oleracea* Mart) pulp improves biomarkers of oxidative stress and the serum lipid profiles in rats. **Nutrition**, London, 2010. In Press. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/pubmed>, acesso em 01/06/2010.

SPADA, P.D.; SOUZA, G.G.; BORTOLINI, G.V.; HENRIQUES J.A.; SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. **Journal of Medical Food** , New York, v. 11, p, 144-151, 2008.

SPADA, P.D.; DANI, C.; BORTOLINI, G. V.; FUNCHAL, C.; HENRIQUES, J.A.; SALVADOR, M. Frozen fruit pulp of *Euterpe oleracea* Mart (Açaí) prevents hydrogen peroxide-induced damage in the cerebral cortex, cerebellum, and hippocampus of rat. **Journal of Medical Food** , New York, v.12, p.1084-1088, 2009.

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

STAHL, W.; SIES, H. Carotenoids and flavonoids contribute to nutritional protection against skin damage from sunlight. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 37, p.26-30, 2007.

TAKEUCHI, P. L.; ANTUNES, L.M.G.; TAKAHASHI, C.S. Modulation of doxorubicin-induced clastogenesis in Wistar rat bone marrow cells by vitamin B(6). **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 82, p. 869-873, 2008.

TALAVÉRA, S.; FELGINES, C.; TEXIER, O.; BESSON,C. ; GIL-IZQUIERDO, A.; LAMAISSON, J.L.; RÉMÉSY, C. Anthocyanin metabolism in rats and their distribution to digestive area, kidney, and brain. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 53, p. 3902-3908, 2005.

TAN, H.H.; POTER, A.G. DNA methyltransferase I is a mediator of doxorubicin-induced genotoxicity in human cancer cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v.382, p. 462-467, 2009.

TICE, R.R., AGURELL, E., ANDERSON, D., BURLINSON, B. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental Molecular Mutagenesis**, New York, v.35, p. 206-221, 2000.

TINOCO, A. C. Açai amazônico: novas perspectivas de negócio. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2005. 1 CD-ROM. Trabalho apresentado no Workshop Regional do Açaizeiro: pesquisa, produção e comercialização, Belém, PA, 2005.

TOAIARI, S.D.A.; YUYAMA, L.K.O.; AGUIAR, J. P.L.; SOUZA, R.F.S. Biodisponibilidade de ferro do açaí (euterpe oleracea) e da farinha de mandioca fortificada com ferro em ratos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 18, p. 291-299, 2005.

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

TRIPATHI, D.N.; JENA, G.B. Intervention of asataxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: a study in mice. **Clinics**, São Paulo, v.63, p.821-826, 2008.

TUPINAMBÁ, D. Análise comparativa da eficácia de evidenciadores de placa dental à base de corantes naturais x sintéticos. Belém: Universidade Federal do Pará [dissertação de mestrado] 54 p. Curso de Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, 2006.

UENO, S.; KASHIMOTO, T.; SUSAN, N.; NATSUME, H.; TOYA, M.; NOBUHIKO, I.; TAKEDA-HOMMAC, S. SASAKI, Y.; SUGIYAMA, M. Assessment of DNA damage in multiple organs of mice after whole body X-irradiation using the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 634, p.135-145, 2007.

YAMAUCHI, R.; MIYAKE, N.; INOUE, H.; KATO, K. Products formed by peroxy radical oxidation of beta-carotene. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v.41, p.708-713, 1993.

YOSHIMOTO, M.; OKUNO, S.; YAMAGUSHI, M.; YAMAKAWA, O. Antimutagenicity of deacylated anthocyanins in purple-fleshed sweet potato. **Bioscience Biotechnology Biochemistry**, Tokyo, v.65, p.1652-1655, 2001.

YUYAMA, L.K.; YONEKURA, L.; AGUIAR, J.P.L.; SOUSA, S.R.F. Biodisponibilidade dos carotenóides do buriti (*Mauritia flexuosa* L.) em ratos. **Acta Amazônica**, Manaus, v.28, p. 409-415, 1998.

VALADARES, B.L.B; GRAF, U.; SPANO, M.A. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p. 1103-1110, 2007.

VARGAS, R.M. Biodisponibilidade do β -caroteno do pó da folha de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) em ratos. 2007 [dissertação de mestrado], 96 p. Brasília: Universidade de Brasília, Faculdade de Ciências da Saúde, 2007.

VASQUEZ, M.Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**, Oxford, v. 25, p. 187-189, 2009.

WANG, H.; CAO, G.H.; PRIOR, R.L. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. Washington , v. 45, p. 304–309, 1999.

WANG Y., ILLINGWORTH, D.R.; CONNOR, S.L.; DUELL, B.P. Competitive inhibition of carotenoid transport and tissue concentrations by high dose supplements of lutein, zeaxanthin and beta-carotene. **European Journal Nutrition**, London, v. 49, p.327-336, 2010.

WATERS, M.D.; BRADY, A.L.; STACK, H.F.; BROCKMAN, H.E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research**, Amsterdam, v.238, p. 57-85, 1990.

WARGOVICH, M.J. Experimental evidence for cancer preventive elements in foods. **Cancer Letters**, Amsterdam, v.114, p.11-17, 1997.

WEISBURGER, J. H. Carcinogenicity and mutagenicity testing, then and now. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 437, p. 105-112, 1999.

WHO. Guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. World Health Organization, Geneva 2004.

ZAMORANO-PONCE, E.; MORALES, C.; RAMOS, C.; SEPÚLVEDA, C.; CARES, C.; RIVERA, P.; FERNÁNDEZ, J.; CARBALLO, A.M. Anti-genotoxic effect of Aloysia triphylla infusion against acrylamide-induced DNA damage as shown by the comet assay technique. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 603, p. 145- 150, 2006.

ZANATTA , C.F.; UGARTONDO, V. ; MITJANS, M.; ROCHA-FILHO, P.A.; VINARDELL , B.M.P. Low cytotoxicity of creams and lotions formulated with Buriti oil (*Mauritia flexuosa*) assessed by the neutral red release test. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 46, p.2776-2781, 2008.

ZANATTA, C.F.; MITJANS, M.; UGARTONDO, V.; ROCHA-FILHO, P.A.; VINARDELL, B.M.P. Protective potential of emulsion formulated with buriti oil (*Mauritia flexuosa*) against UV irradiation on keratinocytes and fibroblasts cell lines. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, p. 70-75, 2010.

ZORZETTO, R. Os primeiros sinais de alerta. 2005. **Revista FAPESP**, São Paulo, n. 115, p. 46-49, 2005.

Anexo 1 - Metodologias empregadas na caracterização
fitoquímica da polpa de açaí e do óleo de buriti

1. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DA POLPA DE AÇAÍ

Carotenóides, antocianinas, compostos fenólicos e flavonóides da polpa de açaí foram analisados em um equipamento de cromatografia líquida de alta eficiência (HPLC) da marca Shimadzu (Kyoto, Japan) com bombas quaternárias (modelo LC-20AD), conectado a um detector de fotodiodo em série (PDA) (Shimadzu, modelo SPD-M20A) e espectrômetro de massa com detector de “íon-trap” (MS/MS), modelo Esquire 4000 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha). A extração de todos os compostos bioativos foi feita em triplicata.

1.1. CAROTENÓIDES:

Os carotenóides foram extraídos com acetona a partir de 15,0 g de polpa de açaí, transferida para éter de petróleo/ dietil éter, saponificado “overnight” a temperatura ambiente com 10 % de KOH metanólico, lavado até estar livre de substâncias alcalinas, e concentrado em um evaporador rotatório ($T < 35\text{ }^{\circ}\text{C}$) até secar. As condições experimentais para separação, identificação, e quantificação por HPLC-PDA-MS/MS foram descritas previamente por De Rosso e Mercadante, (2007^a). O conteúdo de carotenóides totais foi obtido por HPLC-PDA, considerando todos os picos identificados. Os componentes fenólicos foram extraídos a partir de 10,0 g de polpa de açaí com 100 mL de metanol em água (8:2) por agitação em um homogenizador (Metabo, Nürtingen, Germany). A mistura foi filtrada, e a parte sólida foi lavada com a adição de 50 mL de água de metanol (8:2) e concentrada em um evaporador rotatório ($T < 38\text{ }^{\circ}\text{C}$) até a evaporação de metanol.

1.2. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS:

Os componentes fenólicos totais foram quantificados usando reação de Folin-Ciocalteu (SINGLETON; ROSSI, 1965) e o total de flavonóides por método de Zhishen, os resultados foram expressos em equivalente de ácido gálico (GAE) e catequina (CE), respectivamente. A análise de compostos fenólicos em HPLC-PDA-MS/MS em coluna C18 Synergi Fusion column (Phenomenex, Torrance, California, USA), usando como fase móvel um gradiente linear de metanol/2 % ácido fórmico (v/v). Os cromatogramas foram processados a 350 nm e o espectro foi obtido entre 250 e 600 nm. Todos os compostos fenólicos foram quantificados por HPLC como catequina equivalente, usando curva de calibração de catequina com um mínimo de 5 níveis de concentrações.

1.3. ANTOCIANINAS

As antocianinas foram extraídas a partir de 10,0 g da polpa de açaí com 100 mL de 0.5 % HCl em metanol, “overnight” a 5 °C no escuro. A mistura foi filtrada e a parte sólida foi lavada com a adição de 100 mL de HCl 0.5 % em metanol a temperatura ambiente. As condições experimentais de separação, identificação e quantificação por HPLC-PDA-MS/MS seguiram o protocolo descrito por De Rosso e Mercadante (2007^b).

2. CARACTERIZAÇÃO FITOQUÍMICA DO ÓLEO DE BURITI POR HPLC

Para o óleo de buriti foram caracterizados fenóis totais, carotenóides totais, tocoferóis e tocotrienóis. Padrões de all-trans- de luteína, zeaxantina, β - criptoxantina, β -caroteno e α -caroteno, assim como dos isômeros 9-cis-, 13-cis-

e 15-cis- β -caroteno foram cedidos pela DSM Nutritional Products (Basel, Suíça), apresentando 93 a 99 % de pureza (HPLC-DAD).

2.1. COMPOSTOS FENÓLICOS TOTAIS

Os compostos fenólicos foram extraídos com 2,5 mL de metanol/água (8:2) a partir de 2,5 g de óleo de buriti dissolvidos em 2,5 mL de hexano, por meio de agitação em vortex seguida de centrifugação a 5000 rpm por 5 min, sendo esse procedimento repetido 3 vezes. A fase metanólica foi recolhida e o solvente foi evaporado sob vácuo em evaporador rotatório ($T < 37\text{ }^{\circ}\text{C}$). Imediatamente antes da reação para quantificação, o extrato foi dissolvido em um volume final de 5,0 mL de metanol. A quantificação foi realizada pelo método de Folin-Ciocalteu, segundo Singleton & Rossi (1965), utilizando curva de calibração de ácido gálico (12,5-150 mg/L), sendo os resultados expressos em mg equivalente de ácido gálico (GAE)/100 g amostra. As leituras de absorbância a 765 nm foram realizadas em um multi-leitor de microplacas Synergy Mx (Biotek, Winooski, EUA).

2.2. CAROTENÓIDES

Amostras de 0,10 g de óleo de buriti foram dissolvidas em éter de petróleo. O conteúdo de carotenóides totais foi determinado por espectrofotometria em um espectrofotômetro Agilent 8453 (Santa Clara, EUA). A concentração de carotenóides foi calculada utilizando o valor de absorvidade do β -caroteno a 453 nm (DAVIES, 1976).

Os carotenóides foram extraídos por meio de extração líquido-líquido a partir de 2,0 g de óleo de buriti dissolvidos em acetona, utilizando éter de

petróleo/éter etílico (2:1). Em seguida, o extrato foi submetido à saponificação com 10 % de KOH em metanol a temperatura ambiente por uma noite. Após lavagem para retirada completa do álcali, o solvente foi evaporado completamente em evaporador rotatório ($T < 40^{\circ}\text{C}$).

Os carotenóides foram separados em coluna C30 YMC (5 μm , 250 x 4,6 mm i.d.) (Waters, Wilmington, EUA), usando como fase móvel um gradiente linear de metanol/éter metil terc-butilico (MTBE) de 95:5 para 70:30 em 30 min, seguindo para 50:50 em 20 min e mantendo essa proporção por 35 min, com fluxo de 0,9 mL/min e temperatura da coluna de 29°C . Os espectros de absorção UV-visível foram adquiridos entre 250 e 650 nm e os cromatogramas foram processados em 280, 350 e 450 nm. A análise por espectrometria de massas foi realizada nas seguintes condições: ionização no modo positivo, corrente de 4,0 mA, temperatura da fonte de 450°C , temperatura do gás de secagem (N_2) 350°C e fluxo de 5 L/min, nebulizador a 45 psi. O MS/MS foi adquirido no modo automático, aplicando energia de fragmentação de 1,4 V. A faixa de varredura para os espectros de massas foi de m/z 100 a 700.

A identificação dos carotenóides foi realizada com base nos resultados combinados dos seguintes parâmetros: ordem de eluição na coluna C30, características dos espectros UV-visível (λ máx, estrutura fina do espectro (%III/II) e intensidade do pico “cis” (%AB/All) e de massas, comparando com padrões analisados nas mesmas condições e com dados disponíveis na literatura (BACK; ENZELL, 1995; BROTON, 1995; BRITTON et al., 2004; DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^a, DE ROSSO; MERCADANTE, 2007^b).

2.3. TOCOFERÓIS E TOCOTRIENÓIS

Os tocoferóis e tocotrienóis foram determinados de acordo com o método oficial da American Oil Chemist's Society (AOCS, 2004) por meio de cromatografia líquida de alta eficiência, usando um sistema de bombeamento isocrático (Perkin Elmer Series 200, Norwalk, EUA) e um detector de fluorescência (Perkin Elmer Series 2007^a), sendo que os comprimentos de onda de excitação e emissão foram 290 e 330 nm, respectivamente. Os tocoferóis e tocotrienóis foram separados em uma coluna Hibar RT (5 µm, 250 x 4 mm i.d.) Li Chrosorb Si (Merck, Darmstadt, Alemanha), usando como fase móvel hexano/isopropanol (99:1) com fluxo de 1,0 mL/min.

Anexo 2 - Composição nutricional do óleo de milho

Composição nutricional do óleo de milho utilizado como solvente nos tratamentos com óleo de buriti

Informação Nutricional porção de 13 ml		
Quantidade por porção		%VD*
Valor calórico	108 Kcal	5
Carboidratos	0g	0
Proteínas	0g	0
Gorduras totais	12g	17
Gorduras saturadas	1,8g	-
Gorduras monoinsaturadas	4,3g	-
Polinsaturadas	5,9g	-
Ômega 6 (ácido linoléico)	5,7g	-
Fibra Alimentar	0g	0
Colesterol	0 mg	0
Sódio	0 mg	0
Vitamina E	2 mg	20

* Valores Diários de Referência com base em uma dieta de 2.500 calorias.

** Fonte: informações fornecidas pelo fabricante, contidas no rótulo do produto.

Anexo 3 – Parecer de aprovação da comissão de ética no uso de animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 06.1.909.53.7), intitulado: "Avaliação dos Efeitos Antimutagênicos de Pigmentos Naturais Isolados de Alimentos", de autoria de **Lusânia Maria Gregg Antunes**, por estar de acordo com os **Princípios Éticos na Experimentação Animal** adotado pela **Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)** do *Campus* de Ribeirão Preto – USP foi aprovado em reunião da CEUA de 03.10.06.

Ribeirão Preto, 4 de outubro de 2006

Presidente da CEUA
Prof. Dr. Wagner Ferreira dos Santos

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro