

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do
fruto da palmeira juçara
(*Euterpe edulis* Martius) em ratos Wistar

Bruno Franco Fernandes Barbosa

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do
fruto da palmeira juçara
(*Euterpe edulis* Martius) em ratos Wistar

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

Área de Concentração: Toxicologia

Orientado: Bruno Franco Fernandes Barbosa

Orientador: Prof(a). Dr(a). Maria de Lourdes Pires
Bianchi

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 04/09/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2014

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.

Barbosa, Bruno Franco Fernandes

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em ratos Wistar. Ribeirão Preto, 2014.

73 p. : il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Bianchi, Maria de Lourdes Pires

1. *Euterpe edulis* Martius. 2. Mutagênese. 3. Antocianinas. 4. Metil-metanosulfonato.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Bruno Franco Fernandes Barbosa

Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em ratos Wistar

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Prof(a). Dr(a). Maria de Lourdes Pires Bianchi

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____
Instituição: _____ Assinatura: _____

*Aos meus pais, Nilda e Fernando
À minha irmã, Lorena*

Agradecimentos

Primeiramente, agradeço a Deus que nos concede valiosas oportunidades na vida, mostrando os caminhos certos e propícios para a nossa evolução, além de nunca nos desamparar nos momentos mais difíceis.

Aos meus pais, Nilda e Fernando, que, com muito amor, me forneceram a base moral para que eu pudesse seguir meus próprios passos, com honestidade e respeito. Por serem meu porto seguro e meu maior exemplo. Não consigo expressar em palavras todo o meu amor e gratidão por vocês. Tudo que eu consegui até hoje, devo totalmente a vocês.

À minha irmã Lorena, que sempre foi, e sempre será, a minha melhor companhia. Lembro-me que quando éramos crianças, te protegia e te levava comigo para onde quer que eu fosse. Crescemos e, mesmo hoje, morando em cidades diferentes, meu instinto de irmão “protetor” continua gigante, proporcional ao meu amor por você.

À minha orientadora Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi, pela oportunidade e confiança a mim depositadas. Agradeço por todos os conselhos, pelas conversas, pelo apoio e, principalmente, pelo auxílio prestado nas mais variadas circunstâncias. A sua generosidade é proporcional à sua competência profissional. A senhora é uma referência de mestre, pesquisadora e profissional bem-sucedida para mim.

À Profa. Dra. Lusânia Maria Gregg Antunes, pelo seu profissionalismo, pelo rigor científico e pelas valiosas sugestões que foram fundamentais para a melhor condução deste trabalho. A sua competência no ensino e na pesquisa são admiráveis.

À Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante, da Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas (FEA-UNICAMP), por ter disponibilizado o seu laboratório para que pudessem ser realizadas a liofilização e a análise fitoquímica da polpa do fruto de juçara.

À Dra. Lilian Regina Barros Mariutti, da FEA-UNICAMP, por ter realizado a liofilização e análise fitoquímica da polpa do fruto de juçara. Agradeço, também, pela disponibilidade em me atender sempre quando necessário.

À Profa. Dra. Lee Chen Chen, da Universidade Federal de Goiás, por auxiliar no tratamento estatístico dos meus dados. Agradeço, também, pelos ótimos conselhos e pela grande amizade.

Aos técnicos do Laboratório de Nutrigenômica, Regislaine Valéria Burim, Joana D’arc Castania Darin e Jefferson Codognotto, pela competência e disponibilidade em me auxiliar. Agradeço, em especial, à Regislaine e à Joana pela ajuda, tão fundamental, na execução dos meus experimentos.

Aos meus colegas de laboratório, Alexandre Ferro, Carla Machado, Fábio Henrique, Farah Chequer, Lívia Hernandez, Mara Ribeiro, Michela Bianchi, Tarsila Gomes e Vinícius Venâncio, pela agradável companhia.

Aos meus amigos de Ribeirão Preto: Airton, Larissa, Gustavo, Arielle, Inajara, Leandro, Luiz Gustavo, Christian, Paulo, Lêda, Marco Túlio, Rosana e Ferdinando. Obrigado pela companhia e por estarem ao meu lado em tantos momentos marcantes. Tenho muita sorte de ter realizado grandes amizades em tão pouco tempo, amizades que levarei para toda a vida.

Aos funcionários da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, pela gentileza em sempre nos bem atender. Agradeço, em especial, à Rosemary Ioshimine Gerolineto pelo apreço e pela atenção.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho,

Meu muito obrigado!

RESUMO

BARBOSA, B.F.F. **Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade e antigenotoxicidade do fruto da palmeira juçara (*Euterpe edulis* Martius) em ratos Wistar.** 2014. 73 f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A produção do fruto do palmitero juçara tem sido bastante estimulada na região da Mata Atlântica. Este fruto possui elevados teores de compostos bioativos, como antocianinas e outros compostos fenólicos. Devido ao recente estímulo ao consumo deste fruto e ao impacto de compostos bioativos da dieta sobre a estabilidade genômica, os objetivos deste trabalho foram investigar os efeitos citotóxico, genotóxico e antigenotóxico da polpa do fruto da juçara em ratos Wistar, usando o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa. Ratos Wistar machos receberam por gavagem água ou a polpa liofilizada do fruto da juçara reidratada com água (125, 250 ou 500 mg/kg p.c) durante 14 dias. No último dia de tratamento (14^o dia), salina (NaCl, 0,9 %) ou metil-metanosulfonato (MMS, 40 mg/kg p.c.) foram administrados por via intraperitoneal, 24 horas antes da eutanásia. Foram coletados fígado e rins para a análise de glutathiona reduzida (GSH), catalase (CAT), substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) e para a realização do ensaio do cometa. Medula óssea e sangue periférico foram usados para o teste do micronúcleo. Os resultados mostraram que o tratamento com todas as doses da polpa do fruto da juçara não alterou os parâmetros de estresse oxidativo avaliados em rins e fígado de ratos Wistar. Além disso, não foi constatado efeito genotóxico nestes órgãos, nas três doses testadas da polpa do fruto da juçara. Em todas as doses avaliadas, a polpa do fruto da juçara não apresentou efeito mutagênico nem citotóxico em células da medula óssea e do sangue periférico de ratos Wistar. Por outro lado, a polpa do fruto do palmitero juçara apresentou efeito antigenotóxico frente aos danos induzidos pelo MMS em células hepáticas nas doses de 125 e 500 mg/kg p.c. A polpa deste fruto, nestas mesmas doses, também apresentou efeito antimutagênico em células do sangue periférico de ratos Wistar. A polpa liofilizada do fruto da juçara apresentou alta concentração de antocianinas, sendo majoritárias a cianidina-3-glicosídeo e cianidina-3-rutinosídeo. A presença destes compostos bioativos neste fruto pode estar relacionada aos efeitos protetores frente aos danos induzidos pelo MMS, verificados neste presente estudo. Como conclusão, o consumo da polpa do fruto do palmitero juçara, nas doses avaliadas, não induziu genotoxicidade e mutagenicidade em ratos Wistar. Além disso, a administração da polpa do fruto da juçara em associação com o MMS reduziu a genotoxicidade e mutagenicidade induzidas por este agente indutor de danos ao DNA.

Palavras-chave: *Euterpe edulis* Martius; juçara; antocianinas; mutagênese; metil-metanosulfonato

ABSTRACT

BARBOSA, B.F.F. **Cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity evaluation of juçara palm fruit (*Euterpe edulis* Martius) in Wistar rats.** 2014. 73 f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Juçara palm fruit's production has been intensely promoted in the Atlantic Forest region. This fruit has high content of bioactive compounds, including anthocyanins and other phenolic compounds. Due to the recent stimulus to the consumption of this fruit and the impact of dietary bioactive compounds on the genomic stability, this study aimed to evaluate the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic effects of juçara fruit pulp in Wistar rats, using the comet assay and the micronucleus test. Male Wistar rats received water or lyophilized juçara fruit pulp rehydrated with water (125, 250 or 500 mg/kg b.w.) by gavage for 14 days. On the last day of treatment (day 14th), saline (NaCl, 0,9 %) or methyl methanesulfonate (MMS, 40 mg/kg b.w.) were administered intraperitoneally 24 hours before euthanasia. Liver and kidneys were collected for analysis of reduced glutathione (GSH), catalase (CAT), thiobarbituric acid reactive substances (TBARS) and to perform the comet assay. Bone marrow and peripheral blood were used for the micronucleus test. Results showed that treatment with all doses of juçara fruit pulp did not alter the oxidative stress parameters evaluated in kidneys and liver of Wistar rats. Furthermore, no genotoxic effects were observed in these organs, at all doses evaluated. At all tested doses, juçara fruit pulp also showed no mutagenic or cytotoxic effects on cells of bone marrow and peripheral blood of rats. On the other hand, juçara fruit pulp showed antigenotoxic effect at doses of 125 and 500 mg/kg b.w. against MMS-induced DNA damage in liver cells. At these same doses, juçara fruit pulp also exhibited antimutagenic effect on peripheral blood cells of Wistar rats. Juçara fruit pulp exhibited a high concentration of anthocyanins, with cyanidin-3-glucoside and cyanidin-3-rutinoside as major compounds. These bioactive compounds present in this fruit may be related to the protective effects against MMS-induced DNA damage, demonstrated in the present study. In conclusion, juçara palm fruit's consumption, at tested doses, did not induce genotoxicity and mutagenicity in Wistar rats. Furthermore, juçara fruit pulp associated with MMS, a DNA-damaging agent, decreased the genotoxicity and mutagenicity induced by this DNA-damaging agent.

Keywords: *Euterpe edulis* Martius; juçara; anthocyanins; mutagenesis; methyl-methanesulfonate

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Fruto e polpa comercializada do palmitero-juçara | 10 |
| Figura 2. Estrutura química das antocianidinas | 11 |
| Figura 3. Fotomicrografias de nucléoides sem dano e com dano de células hepáticas de ratos Wistar na análise do ensaio do cometa em microscópio de fluorescência | 14 |
| Figura 4. Fotomicrografias obtidas do teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea e reticulócitos do sangue periférico de ratos Wistar contendo micronúcleos | 16 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|----------|--|
| ANOVA | Análise de Variância |
| BER | Reparo por excisão de bases |
| CAS | <i>Chemical Abstracts Service</i> |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| DAD | Detectores de arranjo de diodos |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido Desoxirribonucleico |
| DTNB | Ácido ditionitrobenzóico |
| EDTA | Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| ESI | Ionização por <i>electrospray</i> |
| GPx | Glutaciona peroxidase |
| GSH | Glutaciona reduzida |
| GSSG | Glutaciona oxidada |
| GST | Glutaciona transferase |
| HepG2 | Linhagem de células de carcinoma hepatocelular humano |
| HNE | 4-hidroxi-2-nonenal |
| HPLC-DAD | <i>High-performance liquid chromatography – Photodiode array detection</i> |
| IBGE | Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística |
| i.p. | Intraperitoneal |
| LMP | <i>Low Melting Point</i> |
| MDA | Malondialdeído |
| MMR | Reparo de erros de pareamento |
| MMS | Metil-metanosulfato |
| MN | Micronúcleo |
| MNPCE | Eritrócito policromático micronucleado |
| MNRET | Reticulócito micronucleados |
| MS/MS | <i>Tandem mass spectrometry</i> |
| N3MeA | 3-metil-adenina |
| N7MeG | 7-metil-guanina |
| NADH | Dinucleótido de nicotinamida e adenina |
| NCE | Eritrócitos normocromáticos |

| | |
|-------|---|
| O6MeG | 6-metil-guanina |
| OECD | <i>Organisation for Economic Co-operation and Development</i> |
| p.c | Peso corpóreo |
| PCE | Eritrócitos policromáticos |
| pH | Potencial de Hidrogênio |
| RET | Reticulócitos |
| SBF | Soro Bovino Fetal |
| SOD | Superóxido dismutase |
| TAC | Capacidade antioxidante total |
| TBA | Ácido tiobarbitúrico |
| TBARS | <i>Thiobarbituric acid reactive substances</i> |
| TCA | Ácido tricloroacético |
| TI | <i>Tail Intensity</i> |
| TNB | 2-nitro-5-mercapto-benzóico |
| UDS | <i>Unscheduled DNA synthesis</i> |
| UV | Radiação ultravioleta |
| Vero | Linhagem de células isoladas do epitélio renal de macaco verde africano (<i>Cercopithecus aethiops</i>) |

SUMÁRIO

| | |
|--|------------|
| Resumo | i |
| Abstract | ii |
| Lista de figuras | iii |
| Lista de abreviaturas e siglas | iv |
| | |
| 1. INTRODUÇÃO | 8 |
| 1.1 Alimentos funcionais | 8 |
| 1.2 <i>Euterpe edulis</i> Martius..... | 9 |
| 1.3 Antocianinas..... | 11 |
| 1.4 Ensaio de detecção de danos ao DNA..... | 12 |
| 1.4.1 Ensaio do cometa..... | 13 |
| 1.4.2 Teste do micronúcleo | 15 |
| 1.5 Metil-metanosulfonato (MMS) | 18 |
| 1.6 Biomarcadores de estresse oxidativo..... | 19 |
| | |
| 5. CONCLUSÃO | 24 |
| | |
| 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 26 |
| | |
| ANEXO | 45 |

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Alimentos funcionais

A promoção da saúde abrange um conjunto de medidas destinadas a gerar um impacto favorável na qualidade de vida da população (BRASIL, 2007). Desenvolvida pelo Ministério da Saúde, a Política Nacional de Promoção da Saúde contempla a alimentação saudável como um elemento importante na melhoria da saúde e na segurança alimentar e nutricional (BRASIL, 2010). A inserção de um padrão alimentar adequado contribui para a prevenção e controle das doenças crônicas não-transmissíveis e, também, doenças nutricionais e infecciosas (BRASIL, 2005). Alguns alimentos vêm ganhando importância neste aspecto, pois ao serem inseridos na dieta, não só desempenham a função meramente nutritiva, mas também produzem efeitos benéficos à saúde. Estes alimentos são ditos funcionais e suas propriedades se devem à presença de compostos bioativos (SANG, 2014).

Estudos epidemiológicos e ensaios clínicos randomizados têm confirmado ou, pelo menos, sugerido uma série de efeitos positivos na saúde relacionados ao consumo de alimentos funcionais tais como diminuição do risco de câncer e doenças cardiovasculares, redução dos sintomas da menopausa, atividades antiinflamatórias, antimicrobianas e efeitos antiobesidade (SIRTORI et al., 2009; AL-SHERAJI et al., 2013; ZENG et al., 2013). O consumo de frutas, legumes e hortaliças tem sido recomendado, pois podem prevenir doenças degenerativas e o risco de câncer por conterem compostos bioativos com ação antioxidante e sequestrante de radicais livres (RAMASSAMY, 2006; LAKO et al., 2007; GONZÁLEZ-VALLINAS et al., 2013).

Outros estudos epidemiológicos têm demonstrado que habitantes de países Mediterrâneos têm maior expectativa de vida e um menor risco de apresentar doenças crônicas incluindo diabetes, doenças cardiovasculares e câncer (LA VECCHIA, 2004; PELUCCHI et al., 2009; SALAS-SALVADÓ et al., 2011; ESTRUCH et al., 2013). Tal fato se deve à presença de compostos bioativos como polifenóis, flavonoides, fitoesteróis, ácidos graxos poliinsaturados, isoflavonas, carotenos e fibras encontrados em frutas, legumes e vegetais abundantes na dieta destes países (ORTEGA, 2006).

Estudos recentes têm relatado a presença de compostos fenólicos, com comprovada atividade antioxidante, em frutos nativos de diferentes biomas

brasileiros. Como exemplos: o piquiá (*Caryocar villosum*) e o jambolão (*Syzygium cumini*), frutos da região Amazônica ricos em carotenoides e antocianinas, respectivamente (DE BRITO et al., 2007; ALMEIDA et al., 2012; CHISTÉ et al., 2012); o araticum (*Annona coriacea*), nativo do cerrado, que apresenta altos teores de ácido ascórbico e compostos fenólicos (DE SOUZA et al., 2012) e a pitanga (*Eugenia uniflora*), fruto nativo da Mata Atlântica que apresenta compostos fenólicos e carotenoides em sua composição (BAGETTI et al., 2011).

1.2 *Euterpe edulis* Martius

A Mata Atlântica concentra um grande número de espécies endêmicas e ameaçadas de extinção e, apesar da sua grande extensão territorial exibe, atualmente, menos de 8 % da sua cobertura florestal original (LAGOS; MULLER, 2007). A destruição da Mata Atlântica vem ocorrendo devido à intensa exploração de seus recursos naturais bem como à atividade agropecuária e ao desmatamento decorrente da implantação de projetos de infraestrutura (GALINDO-LEAL; CÂMARA, 2005).

Pertencente à família Arecaceae, a juçara ou içara (*Euterpe edulis*) é uma palmeira monocaule, de copa globosa, estipe reto e que pode chegar a até 25 metros de altura (LORENZI et al., 2004). Nativa da Mata Atlântica, esta palmeira produz um palmito que possui excelente qualidade comercial e a intensa exploração extrativista do mesmo, tem levado ao gradativo esgotamento da espécie nas reservas naturais (SILVA; BARRETO; SERÔDIO, 2004).

Considerada espécie-chave no seu ecossistema, a extinção do palmitero juçara pode trazer prejuízos ecológicos que podem afetar a fauna e flora local (DOS REIS et al., 2000). Como não há rebrota após a extração do palmito (TSUKAMOTO et al., 2001), uma das principais estratégias adotadas para a manutenção da espécie é a exploração dos seus frutos (PALUDO; SILVA; REIS, 2012). Programas de incentivo à produção do fruto da juçara têm sido conduzidos em comunidades locais a fim de se agregar recursos financeiros e garantir a preservação da espécie e da Mata Atlântica (IPEMA, 2010).

O fruto da juçara apresenta, em média, 14 mm de diâmetro e, quando bem maduro, apresenta coloração que varia de violeta a azul escuro (figura 1 –A) (FLEIG; RIGO, 1998; RIBEIRO; MENDES; PEREIRA, 2011). A polpa (figura 1 – B) produzida

a partir do fruto vem sendo extensamente utilizada na culinária local e é considerada pela população como sendo “mais doce que a polpa do açaí” – fruto de outra espécie do gênero *Euterpe* (SILVA; BARRETO; SERÔDIO, 2004).

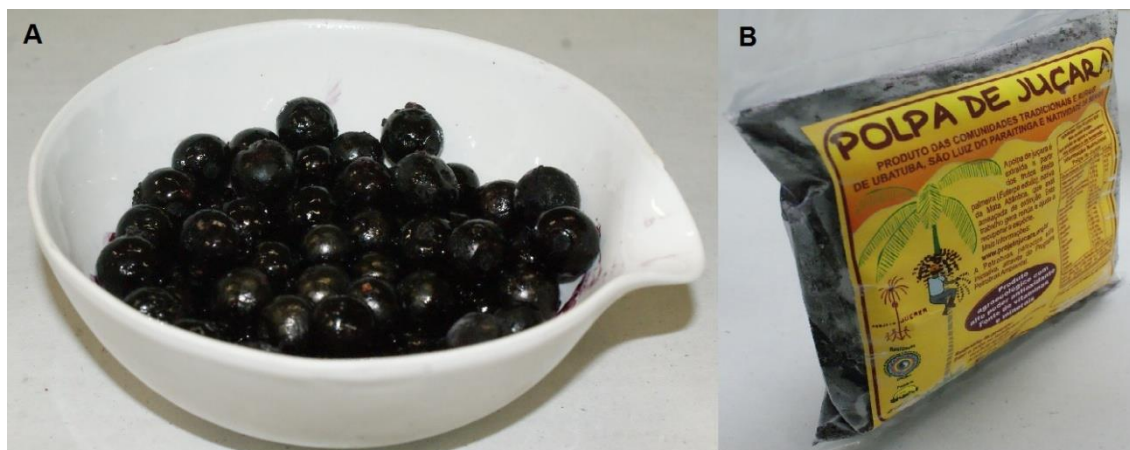


Figura 1 - Fruto (A) e polpa comercializada (B) do palmitreiro-juçara. Fonte: Acervo pessoal. Laboratório de Nutrigenômica / FCFRP-USP.

Em trabalho realizado por De Brito et al. (2007), o teor de antocianinas totais encontrado no fruto da juçara (2956 mg/ 100 g de massa seca) foi muito superior ao de outras frutas tropicais, tais como a acerola roxinha, o guajiru e o jambolão (respectivamente, 261, 958 e 771 mg/ 100 g de massa seca). Em estudo mais recente, Inácio et al. (2013) verificaram que o teor total de antocianinas monoméricas encontrado no fruto da juçara (36,9 g/kg) foi, também, muito superior ao do açaí (3,3 g/kg).

Outros estudos também realizaram a caracterização fitoquímica do fruto de *E. edulis*, como em trabalho realizado por Borges et al. (2011), onde foram identificados compostos fenólicos, incluindo ácido ferúlico, salicílico, gálico, hidroxibenzóico, p-cumarínico, catequinas, epicatequinas e quercetina, além de um elevado teor de antocianinas ($409,85 \pm 2,33$ mg/100g fruto fresco). Além disso, foram identificadas por De Brito et al. (2007), como sendo compostos antociânicos majoritários no fruto da juçara: a cianidina-3-glucosídeo (1358 mg/100 g de massa seca) e a cianidina-3-rutinosídeo (1565 mg/100 g de massa seca). Bicudo, Ribani e Beta (2014) constataram, também, a predominância da cianidina-3-glucosídeo e a cianidina-3-rutinosídeo no fruto da juçara, em diferentes estágios de maturação do mesmo.

1.3 Antocianinas

As antocianinas são flavonoides formados pelo metabolismo dos fenilpropanoides, que são compostos orgânicos derivados da fenilalanina. As antocianinas são pigmentos hidrossolúveis que colorem, em azul, vermelho ou violeta, frutos e flores de diversas plantas (GLOVER; MARTIN, 2012). Na natureza, estes flavonoides são encontrados, principalmente, na forma de heterosídeos. A posição e o número de substituintes hidroxil e metoxil, em sua estrutura molecular (Figura 3), podem dar origem a dezenas de diferentes antocianidinas, dentre as quais, seis são, comumente, encontradas em frutos e vegetais (PASCUAL-TERESA; SANCHEZ-BALLESTA, 2008).

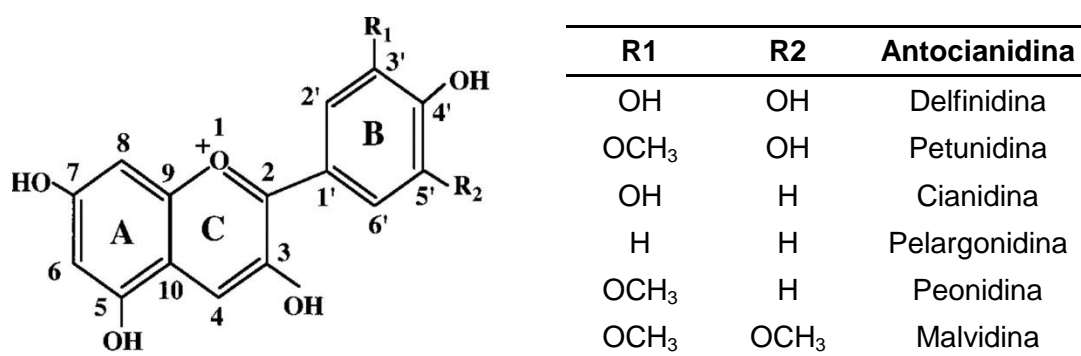


Figura 2 - Estrutura química das antocianidinas. Adaptado de HOU et al. (2004).

A estrutura fenólica das antocianinas confere a estes compostos, a atividade sequestradora de radicais livres, como os radicais superóxido (O_2^-) e peroxinitrito ($ONOO^-$) (RAHMAN et al., 2006). A remoção efetiva de outras espécies reativas de oxigênio (ERO), tais como o radical hidroxil (OH^-), radical peróxido (ROO^-), o oxigênio singlete (1O_2) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), caracteriza, também, a intensa atividade antioxidante atribuída às antocianinas que é comparável à atividades de outros antioxidantes, como o ácido ascórbico, α -tocoferol, β -caroteno, ácido clorogênico e glutatona (WANG; JIAO, 2000).

Segundo Wang e Stoner (2008), a atividade anticarcinogênica das antocianinas está, primariamente, relacionada à sua capacidade de sequestrar ERO. Ainda, de acordo com estes autores, este efeito produzido pelas antocianinas, pode estar relacionado ao estímulo da expressão de enzimas de detoxificação de fase II do metabolismo, aumento da capacidade antioxidante das células, redução da

formação de adutos oxidativos no DNA, diminuição da peroxidação lipídica e redução da proliferação celular pela modulação das vias de transdução de sinais. Alguns estudos têm descrito a relação entre a atividade antioxidante de diferentes derivados antociânicos com a produção de efeitos antígenotóxicos (DEVI; KUMAR; DAS, 2012; DEL BO' et al., 2013; SARKAR et al., 2014).

Estudos epidemiológicos têm atribuído uma relação inversa entre o alto consumo de polifenóis na dieta e a incidência de doenças crônicas não transmissíveis. As antocianinas estão entre os polifenóis mais abundantes em frutas e vegetais e, devido à sua capacidade antioxidante, apresenta uma série de efeitos benéficos à saúde relacionados ao seu consumo, como exemplo: a prevenção de doenças cardiovasculares e neurodegenerativas, controle da obesidade, e também, potenciais anti-inflamatório, anticarcinogênicos, antidiabético e antimicrobianos (HE; GIUSTI, 2010; TSUDA, 2012).

Ao se considerar que o consumo de frutos ricos em compostos antioxidantes podem produzir efeitos benéficos à saúde (RAMASSAMY, 2006; LAKO et al., 2007), a investigação de seus efeitos genotóxicos e antígenotóxicos tem ganhado grande importância devido à modulação/interferência exercida por esses produtos em diversos mecanismos biológicos. Ensaio de genotoxicidade *in vivo* são conduzidos para se avaliar a segurança de determinada substância em fase pré-clínica de estudos e também podem servir como ferramenta para a detecção da potencialidade genotóxica/antígenotóxica de componentes da dieta (ROTHFUSS et al., 2011).

1.4 Ensaio de detecção de danos ao DNA

A integridade genômica é continuamente defrontada a uma variedade de processos e a agentes que podem causar lesões diretas no DNA ou, então, alterações permanentes (mutações), quando o dano a este material genético não é eficientemente reparado (LORD; ASHWORTH, 2012). Os eventos endógenos que levam ao dano ao DNA são desencadeados, principalmente, pela geração endógena de ERO. A formação de ERO, oriundos do metabolismo, leva à oxidação das bases nitrogenadas e a quebras de fita simples e dupla e, por consequência a esta geração de ERO, ocorre a formação de produtos da lipoperoxidação lipídica, que forma adutos exocíclicos com o DNA, e a de mutágenos eletrofílicos, resultantes da oxidação do DNA e de macromoléculas (DE BONT; VAN LAREBEKE, 2004).

Processos inflamatórios também podem causar danos ao DNA através da formação endógena de espécies reativas de oxigênio e/ou nitrogênio (MURATA et al., 2012)

Os agentes exógenos ou ambientais podem atuar de diferentes formas para causar danos ao DNA. A radiação ionizante induz diversas lesões no DNA, sendo a quebra de fita dupla, biologicamente, a mais relevante (SCHANZ et al., 2012). A radiação ultravioleta (UV) induz a formação de dímeros de pirimidinas altamente mutagênicos e, também, leva à geração de ERO que podem causar danos ao DNA (PFEIFER; BESARATINIA, 2012). Outras fontes exógenas responsáveis por danos oxidativos ao DNA incluem as lesões geradas por raios-X, raios gama, partículas de radiação α e xenobióticos oxidantes (KRYSTON et al., 2011). Alguns xenobióticos, tais como o formaldeído e o cloreto de vinila, são capazes de formar adutos no DNA que são danos mutagênicos associados ao processo de carcinogênese (SWENBERG et al., 2011).

Considerando que o dano ao DNA pode interferir em processos celulares essenciais, como a replicação e a transcrição, além de poder levar à morte celular e induzir mutações que causam câncer e que contribuem para o processo de envelhecimento (HOEIJMAKERS, 2009), torna-se importante avaliar possíveis eventos que levam à instabilidade genômica bem como àqueles ligados à manutenção da estabilidade do genoma.

Agências regulatórias recomendam a realização de ensaios de detecção de danos ao DNA, para se verificar o potencial genotóxico de agentes exógenos e prever seus eventuais efeitos carcinogênicos em humanos (EFSA, 2011; ICH, 2012). Estes ensaios podem ser realizados em diferentes componentes celulares, tanto em procariontes como em eucariontes e ser de curta ou longa duração. Podemos destacar, dentre os ensaios de curta duração, o ensaio do cometa e o teste do micronúcleo em células de roedores (HAYASHI et al., 2000; SASAKI et al., 2000; ROTHFUSS et al., 2011).

1.4.1 Ensaio do cometa

O ensaio do cometa se baseia na detecção de danos ao material genético de células que, ao serem depositadas sobre lâminas de agarose e terem suas membranas lisadas, têm o seu DNA aderido à agarose – DNA livre de histonas, empacotado (também chamado de nucleóide). Quando os nucleóides são

submetidos a uma eletroforese, ocorre a migração do DNA fragmentado sobre o gel de agarose e, posteriormente, os fragmentos ao serem visualizados, formam uma estrutura que se assemelha a um cometa (Figura 3). O comprimento e a quantidade de DNA na cauda do cometa refletem o dano ao material genético (LIAO; MCNUTT; ZHU, 2009).

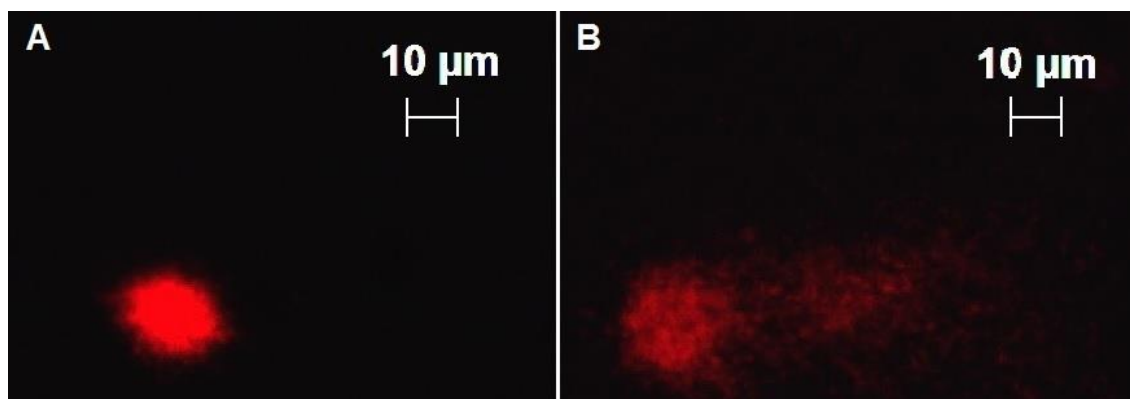


Figura 3 – Fotomicrografias de nucléoides sem dano (A) e com dano (B) de células hepáticas de ratos Wistar na análise do ensaio do cometa em microscópio de fluorescência (filtro 515 – 560 nm). Coloração GelRed™. Aumento de 400X. Fonte: Acervo pessoal. Laboratório de Nutrigenômica / FCFRP-USP.

Inicialmente, o ensaio do cometa foi proposto por Östling e Johanson (1984) em condições de pH neutro, sendo possível identificar lesões de fita dupla no DNA. A versão alcalina do ensaio do cometa foi desenvolvida anos mais tarde por Singh et al. (1988), proporcionando um aumento na sensibilidade da técnica capaz de detectar tanto quebras de fita dupla quanto de fita simples e, também, sítios alcalilábeis e *crosslinks* (TICE et al., 2000).

A mensuração do dano ao DNA nos cometas pode ser realizada por *score* visual ou através da análise de imagens por *softwares* específicos (COLLINS et al., 1997; TICE et al., 2000). Na análise visual, os cometas são classificados em cinco diferentes classes (0-4), onde cada uma representa, de forma crescente, a extensão do dano ao DNA. Por exemplo, cometas de classe zero não apresentam cauda (dano mínimo) e cometas de classe quatro apresentam cabeças pequenas e cauda com a maior parte do conteúdo de DNA do nucléide (dano máximo) (COLLINS; ALGUO; DUTHIE, 1995). Apesar da análise por *score* visual do cometa fornecer resultados quantitativos confiáveis, a análise visual é subjetiva, quantitativamente menos rigorosa e mais suscetível a um viés do analista em comparação às análises automatizadas (AZQUETA et al., 2011).

Além de ser mais rápida do que a análise visual (GYORI et al., 2014), a análise por *softwares* específicos fornece diferentes parâmetros quantitativos como o *Tail Intensity* (percentagem de DNA migrado) e *Tail moment* (fração do DNA migrado multiplicado pelo comprimento da cauda). O *Tail Intensity* (TI) ou % de DNA na cauda é um parâmetro fortemente recomendado na análise automatizada, pois fornece uma clara indicação da aparência do cometa e está, linearmente, relacionado aos diferentes níveis de intensidade de dano ao DNA (HARTMANN et al., 2003).

Apesar de ainda não existir um *guideline* específico da OECD (Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico), o ensaio do cometa *in vivo* é aceito por organizações científicas internacionais (AZQUETA; COLLINS, 2013). Este ensaio possui algumas vantagens em relação a alguns ensaios de genotoxicidade *in vivo* recomendados por agências regulatórias como, por exemplo, o ensaio de síntese de DNA não programada em hepatócitos (UDS). Dentre as vantagens, destacam-se a aplicabilidade em vários tecidos animais, o uso de um número pequeno de células para a análise e a identificação de um amplo espectro de lesões do DNA, tais como, quebras, danos oxidativos ao DNA e *crosslinks* DNA-DNA e DNA-proteína (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Compreendem outras vantagens da técnica: a alta sensibilidade na detecção de danos ao DNA, o baixo custo e a fácil execução (TICE et al., 2000; BURLINSON et al., 2007). A utilização de vários tecidos no ensaio do cometa permite a verificação do dano ao DNA em sítios primários de contato da substância teste e também, a identificação de órgãos alvo afetados pela exposição (VASQUEZ, 2012).

1.4.2 Teste do micronúcleo

O teste do micronúcleo fundamenta-se na detecção de danos cromossômicos e cromatídicos, induzidos por agentes químicos, que resultam na formação de um núcleo secundário, muito menor que o núcleo principal, chamado de micronúcleo (MN) (SCHMID, 1975). Formados durante a mitose, os MN são resultantes de lesões cromossômicas estruturais ou danos ao aparelho mitótico das células parentais. Os MN presentes nas células filhas são, portanto, fragmentos cromossômicos acêntricos, não incorporados no núcleo principal, ou então, cromossomos inteiros

que não migraram para os pólos da célula durante o fuso mitótico (Figura 4) (RIBEIRO, 2003; KIRSCH-VOLDERS et al., 2011).

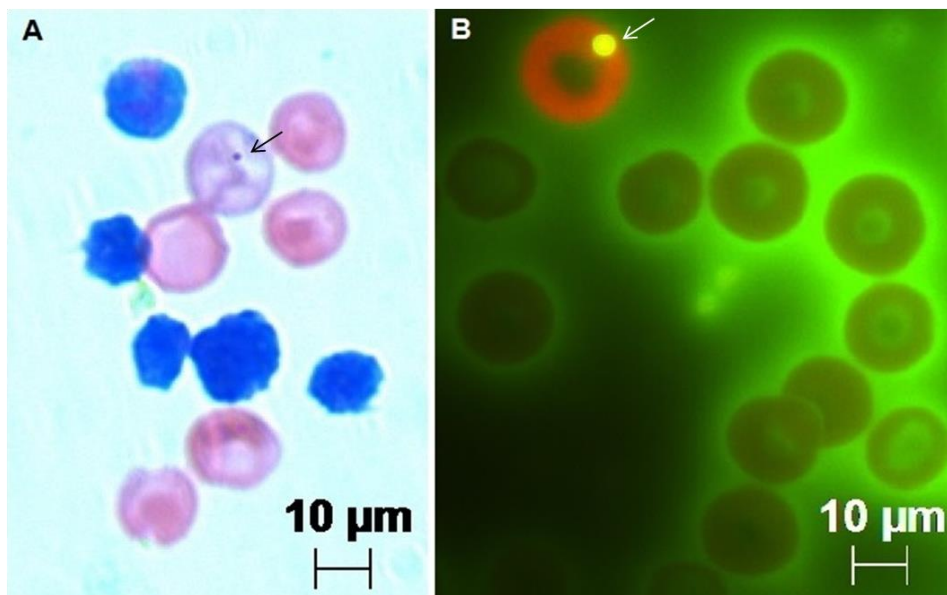


Figura 4 – Fotomicrografias obtidas do teste do micronúcleo em eritrócitos policromáticos da medula óssea (A) e reticulócitos do sangue periférico (B) de ratos Wistar contendo micronúcleos (indicados pelas setas). Coloração Giemsa (A) e Acridina Orange (B). Aumento de 400X. Fonte: Acervo pessoal. Laboratório de Nutrigenômica / FCFRP-USP.

O teste do MN foi originalmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de roedores como um método simples de se detectar danos cromossômicos e cromatídicos, devido à facilidade de visualização do MN - que permanece no citoplasma dos eritrócitos imaturos (ou policromáticos - PCE) após a última divisão celular (SCHMID, 1975). Este teste também tem sido utilizado em reticulócitos do sangue periférico de roedores com resultados equivalentes àqueles obtidos em eritrócitos policromáticos da medula óssea (HOLDEN; MAJESKA; STUDWELL, 1997).

O aumento na frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE's) ou reticulócitos micronucleados (MNRET's) de roedores é indicativo da ocorrência de danos cromossômicos estruturais e/ou numéricos (KRISHNA; HAYASHI, 2000). No teste do MN também é possível avaliar a citotoxicidade da substância-teste na medula óssea, por meio da análise da percentagem de PCE em relação ao total de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCE + NCE) (RIBEIRO, 2003). A citotoxicidade é observada quando há uma redução significativa

na %PCE indicando que houve inibição na divisão e maturação de células eritropoiéticas (MACGREGOR et al., 1987).

O teste do MN pode ser realizado em sistemas *in vitro* utilizando diferentes tipos celulares para o monitoramento de danos genéticos (FENECH, 2000). Porém, a verificação do dano mutagênico através do teste MN em um sistema *in vivo*, leva em consideração os fatores metabólicos deste sistema, os processos farmacocinéticos e de reparo *in vivo* do DNA, o que torna este ensaio de grande relevância na avaliação de risco genotóxico (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Ao detectar a instabilidade genômica, o teste do MN traduz-se, portanto, como importante biomarcador precoce para a carcinogênese (BONASSI et al., 2006). Descrito em *guidelines* de organizações científicas como a OECD (1997), o teste do MN também tem sido recomendado por agências regulatórias como primeira escolha da bateria de ensaios de genotoxicidade *in vivo* para a investigação da mutagenicidade de diferentes xenobióticos (CIMINO, 2006; ICH, 2012), e também tem sido uma ferramenta bastante utilizada para se detectar o potencial mutagênico de frutos e outros componentes da dieta (KHOURI et al., 2007; VIEIRA et al., 2010; SERPELONI et al., 2011; AISSA et al., 2012).

Para uma adequada verificação do potencial genotóxico de uma substância química, diferentes *endpoints* precisam ser avaliados e, somente a utilização de mais de um ensaio de genotoxicidade, garante a cobertura destes diferentes *endpoints* (EFSA, 2011). Neste presente estudo, foram utilizados simultaneamente o ensaio do cometa e o teste do MN. A combinação destes dois ensaios tem sido muito empregada em testes de genotoxicidade *in vivo*, pois, fornece dados complementares dos *endpoints* e órgãos-alvo avaliados, dessa forma, estendendo-se a avaliação genotóxica (ROTHFUSS et al., 2011). Outra vantagem da utilização conjunta destes ensaios é a redução do número de animais utilizados nos protocolos experimentais. Além disso, a associação destes dois ensaios tem sido empregada nos trabalhos do nosso grupo de pesquisa (RIBEIRO et al., 2010; SERPELONI et al., 2010; SERPELONI et al., 2011; AISSA et al., 2012; ALMEIDA et al., 2013; HERNANDES et al., 2014).

1.5 Metil-metanosulfonato (MMS)

Em genética toxicológica, agentes reconhecidamente genotóxicos devem ser incluídos nos protocolos experimentais a fim de se avaliar uma resposta positiva condizente com a indução de danos ao DNA provocada por estes agentes (HAYASHI et al., 2000; TICE et al., 2000). Em ensaios de genotoxicidade *in vivo*, os controles positivos utilizados não podem causar elevada citotoxicidade aos tecidos estudados, bem como excessiva toxicidade ao animal (HARTMANN et al., 2003). No presente estudo, o metil-metanosulfonato (MMS) foi o agente escolhido como controle positivo por induzir danos cromossômicos em células de roedores e também por ser utilizado em ensaios de antigenotoxicidade *in vivo* (ROSA et al., 2007; ULUTAŞ et al., 2011; KATO et al., 2012).

O MMS é um agente alquilante que atua formando monoadutos com centros nucleofílicos do DNA, através de uma reação de substituição do tipo SN2 (JENKINS et al., 2005). Este agente induz, principalmente, a metilação na posição N-7 da guanina (N7MeG), na posição N-3 da adenina (N3MeA) e na posição O-6 da guanina (O6MeG) que representam, respectivamente, 82 %, 11 % e 0,3% do número total de danos causados no material genético (WYATT; PITTMAN, 2006). A lesão N7MeG é por si só inócua, porém a alquilação induzida na posição N3 da adenina é capaz de bloquear a maioria das DNA polimerases, impedindo, assim, a ocorrência do processo de replicação do DNA (FU; CALVO; SAMSON, 2012). Durante a replicação do DNA, a lesão O6MeG leva à incorporação errônea de uma timina ao invés da citosina gerando, no ciclo de replicação seguinte uma mutação de transição (G/C→A/T) (LIPS; KAINA, 2001).

Além de comprometerem a integridade genômica ao induzir mutações e/ou bloquear processos biológicos essenciais como a replicação e a transcrição do DNA, as lesões causadas por agentes alquilantes podem dar origem a intermediários tóxicos, cuja formação está relacionada com as vias de reparo do DNA (FU; CALVO; SAMSON, 2012). A atividade das enzimas DNA glicosilases, envolvidas no processo de reparo por excisão de bases (BER), origina um sítio intermediário abásico, na mesma posição onde se encontrava a base alquilada, que é então, substituído por uma nova base inserida na cadeia de DNA (JENKINS et al., 2005). Este processo mediado por DNA glicosilases é, especialmente, importante no reparo dos adutos formados na posição N3 da guanina e N7 da adenina e quando não há um

adequado controle deste processo, pode haver a acumulação dos produtos intermediários do BER, que são reconhecidamente tóxicos e mutagênicos (JENKINS et al., 2005; FU; CALVO; SAMSON, 2012). Em estudo realizado por Meira et al. (2009) foi demonstrado que a deficiência *in vivo* de DNA glicosilases resulta na total proteção de danos induzidos pelo MMS na retina de camundongos – evidenciando a participação do BER no mecanismo de ação tóxica do MMS.

Em adição às mutações pontuais, a ativação da via de reparo de erros de pareamento (MMR) também está associada à instabilidade genômica causada pela indução da lesão O6MeG por agentes alquilantes (DOAK et al., 2008). A remoção da timina pela via MMR pode gerar *gaps* de fita simples que são sensíveis à ação de nucleases, resultando em quebras de fitas duplas, pela paralisação das forquilhas de replicação do DNA (KAINA et al., 1997). Assim, de modo geral, em consequência da N-metilação e O-metilação induzidas pelo MMS, ocorrem variados danos ao material genético incluindo: o aumento na frequência de aberrações cromossômicas, a indução da troca entre cromátides irmãs, a indução de micronúcleos e quebras do DNA (KAINA et al., 1997; KAINA, 2004; ELHAJOUJI et al., 2011).

Foi demonstrado em vários trabalhos que a administração de uma única dose de MMS pode causar toxicidade ao material genético em vários tecidos de roedores, incluindo medula óssea, fígado e rins (OSHIDA et al., 2008; IGARASHI et al., 2010; CARVALHO et al., 2011; DE MELO et al., 2012). Os efeitos protetores de frutas ou de compostos antioxidantes isolados, tais como bacarina, hipericina e artepilina C, sobre os danos induzidos pelo MMS já foram relatados na literatura (FRANKE et al., 2005; MIADOKOVA et al., 2010; DE AZEVEDO et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2011; MUNARI et al., 2012).

1.6 Biomarcadores de estresse oxidativo

O estresse oxidativo é um evento caracterizado por um desequilíbrio gerado pela superprodução de radicais livres e metabólitos reativos (ERO) e pela diminuição da eliminação destes compostos pelo sistema de defesa antioxidante endógeno (ĎURAČKOVÁ, 2010; RASHID; SINHA; SIL, 2013). O excesso de ERO pode causar danos a lipídios e proteínas celulares e também ao DNA e, por esta razão, o estresse oxidativo está associado a várias doenças humanas, como câncer, doenças

inflamatórias e desordens neurodegenerativas e, também, ao processo de envelhecimento (VALKO et al., 2007).

A reação em cadeia dos radicais livres e ERO com a camada de lipídeos poliinsaturados das membranas celulares é chamada de peroxidação lipídica (NIKI, 2009). Os principais produtos desta reação são a acroleína, 4-hidroxi-2-nonenal (HNE) e o malondialdeído (MDA) - este último, um adequado biomarcador da lipoperoxidação e que pode ser quantificado por meio do teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS – *Thiobarbituric acid reactive substances*) (BUTTERFIELD; BADER LANGE; SULTANA, 2010). Este teste envolve a reação entre o ácido tiobarbitúrico e o MDA, além de outros aldeídos e produtos de decomposição dos hidroperóxidos, que sob condições ácidas e de aquecimento, formam produtos de cor rosa quantificáveis por métodos colorimétricos e fluorimétricos (NIKI, 2014). Os aldeídos produzidos na lipoperoxidação como o HNE e o MDA podem levar a danos ao DNA e são potentes agentes carcinogênicos (WEST; MARNETT, 2006; KARIHTALA; SOINI, 2007).

O efeito dos ERO é balanceado tanto pela atividade de antioxidantes não-enzimáticos como por enzimas antioxidantes. Estes sistemas de defesa podem remover diretamente os radicais livres e metabólitos reativos, proporcionando proteção do organismo contra estes agentes (VALKO et al., 2006). Os variados mecanismos de proteção por antioxidantes abrangem: o impedimento da formação de radicais livres, a interceptação dos radicais livres gerados como produtos do metabolismo da célula ou por fontes externas, o reparo das lesões induzidas por estes radicais e o aumento da produção das enzimas antioxidantes (BIANCHI; ANTUNES, 1999). A remoção catalítica é o principal sistema de proteção antioxidante, e inclui as enzimas intracelulares: glutathione peroxidase (GPx) , superóxido dismutase (SOD) e catalase (CAT) (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004).

A catalase (CAT) é uma enzima tetramérica presente nos peroxissomos e no citosol, responsável pela detoxificação de alcoóis, fenóis e, principalmente, peróxido de hidrogênio (KARIHTALA; SOINI, 2007). Esta enzima catalisa a degradação de duas moléculas de peróxido de hidrogênio, produzindo duas moléculas de água e uma molécula de oxigênio (DÍAZ et al., 2012). A atividade da CAT sob o peróxido de hidrogênio pode ser quantificada por um método espectrofotométrico simples, baseado na absorção do peróxido na região do ultravioleta (BEERS; SIZER, 1952).

O sistema antioxidante não-enzimático engloba os agentes capazes de reduzir os radicais livres via doação de elétrons, dentre eles, destacam-se a glutatona reduzida (GSH) e componentes bioativos da dieta com propriedades antioxidantes (VASCONCELOS et al., 2007; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009). O tripeptídeo GSH é o principal antioxidante deste sistema e encontra-se abundantemente distribuído em vários compartimentos celulares, como no citosol (1-11 mmol/L), no núcleo (3-15 mmol/L) e na mitocôndria (5-11 mmol/L) (VALKO et al., 2007; SENTELLAS et al., 2014).

O antioxidante endógeno GSH é o co-fator utilizado pela enzima GPx, que é responsável pela redução de radicais hidroperóxidos, incluindo o peróxido de hidrogênio e hidroperóxidos lipídicos (KARIHTALA; SOINI, 2007; LU, 2013). A enzima GPx reduz os hidroperóxidos utilizando duas moléculas de GSH que são, então, convertidas em glutatona oxidada (GSSG) (MORRIS et al., 2013). A relação GSH/GSSG é normalmente bem regulada e, em condições como o estresse oxidativo, há o rompimento desta relação (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004). Durante o estresse oxidativo, ocorre a depleção dos níveis de GSH intracelular e o aumento concomitante de GSSG, este desequilíbrio é considerado um estado inicial da cascata de apoptose, que precede a perda da integridade celular (SENTELLAS et al., 2014). Os níveis de GSH podem ser avaliados através da reação entre este tripeptídeo e o ácido ditionitrobenzóico (DTNB), com a formação do ácido 2-nitro-5-mercapto-benzóico (TNB) que é proporcional à quantidade inicial de GSH e pode ser quantificado por métodos fluorimétricos e espectrofotométricos (FORMAN; ZHANG; RINNA, 2009).

O antioxidante GSH participa como co-fator da enzima glutatona-S-transferase (GST) na detoxificação de agentes alquilantes (COLES; KADLUBAR, 2003) e, em consequência desta detoxificação, há a diminuição dos níveis intracelulares de GSH (MICCADEI et al., 1988; MIZUMOTO; GLASCOTT JR; FARBER, 1993). Conforme evidenciado na literatura, ao reduzir os níveis de GSH, agentes alquilantes, inclusive o MMS, podem levar ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio nas células, como o radical hidroxila, provocando lipoperoxidação e perda da integridade das membranas celulares (MICCADEI et al., 1988; MIZUMOTO; GLASCOTT JR; FARBER, 1993; VAN DE WATER; ZOETEWIJ; NAGELKERKE, 1996). Além disso, a indução de estresse oxidativo por xenobióticos

via acumulação de ERO é conhecida por causar a depleção temporária dos níveis de CAT (YANG; CHAO; LIN, 1996).

Dentre os componentes bioativos da dieta que participam do sistema de defesa antioxidante não-enzimático, destacam-se a vitamina C, o β -caroteno, e a vitamina E (tocoferóis e tocotrienóis) e os flavonóides (VALKO et al., 2007; LIMÓN-PACHECO; GONSEBATT, 2009). Os derivados flavônicos, incluindo as antocianinas, possuem reconhecido efeito antioxidante devido à capacidade destes compostos de sequestrar radicais livres, inibir oxidases, quelar metais como ferro e cobre que promovem a formação de ERO e a ativar enzimas de detoxificação (fase II) (RAVISHANKAR et al., 2013). Contudo, em determinadas condições, os flavonoides podem atuar como prooxidantes promovendo a oxidação de outras biomoléculas, tais como lipídeos, proteínas e DNA (PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

As poucas investigações sobre a juçara têm mostrado que seu fruto é rico em compostos bioativos, incluindo antocianinas e outros compostos fenólicos (DE BRITO et al., 2007; BORGES et al., 2011). Compostos biologicamente ativos provenientes da dieta têm sido relacionados com a promoção da saúde, além disso, podem ter efeitos moduladores sobre os danos induzidos ao DNA servindo como alvos para estratégias de quimioprevenção (COLLINS; HARRINGTON, 2002; CHEN; CHEN, 2013; THAKUR et al., 2014). Devido ao recente estímulo ao consumo do fruto da juçara e ao impacto na saúde de compostos bioativos da dieta, sobretudo seus efeitos sobre o material genético, torna-se importante investigar o efeito genotóxico e antígenotóxico da polpa do fruto da juçara, para fornecer importantes contribuições sobre a segurança de seu consumo bem como a promoção da utilização deste fruto por parte da população. A hipótese deste trabalho é que a polpa do fruto da juçara não cause danos ao DNA de células normais de ratos e apresente efeitos protetores contra os danos induzidos pelo MMS ao DNA destas células.

CONCLUSÕES

2. CONCLUSÕES

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que o tratamento, durante 14 dias, com a polpa do fruto do palmito juçara em ratos Wistar:

- ✓ Não foi genotóxico em células hepáticas e renais, em todas as doses testadas.
- ✓ Nas doses de 125 e 500 mg/kg p.c., apresentou efeito antigenotóxico sobre os danos induzidos pelo MMS em células hepáticas.
- ✓ Não apresentou efeito citotóxico, em todas as doses avaliadas, em células da medula óssea.
- ✓ Não apresentou efeito mutagênico, em todas as doses testadas, no sangue periférico e na medula óssea.
- ✓ Nas doses de 125 e 500 mg/kg p.c., apresentou efeito antimutagênico em células do sangue periférico.
- ✓ Não induziu estresse oxidativo, em todas as doses testadas, no tecido hepático e renal.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

3. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AISSA, A. F.; BIANCHI, M. L. P.; RIBEIRO, J. C.; HERNANDES, L. C.; DE FARIA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; ANTUNES, L. M. G. Comparative study of β -carotene and microencapsulated β -carotene: Evaluation of their genotoxic and antigenotoxic effects. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 5, p. 1418-1424, 2012.

AL-SHERAJI, S. H.; ISMAIL, A.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R. M.; HASSAN, F. A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 5, n. 4, p. 1542-1553, 2013.

ALMEIDA, M.; DARIN, J. A.; HERNANDES, L.; AISSA, A.; CHISTÉ, R.; MERCADANTE, A.; ANTUNES, L.; BIANCHI, M. Antigenotoxic Effects of Piquiá (*Caryocar villosum*) in Multiple Rat Organs. **Plant Foods for Human Nutrition**, Elmsford, v. 67, n. 2, p. 171-177, 2012.

ALMEIDA, M. R.; AISSA, A. F.; GOMES, T. D. U. H.; DARIN, J. D. A. C.; CHISTÉ, R. C.; MERCADANTE, A. Z.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. In Vivo Genotoxicity and Oxidative Stress Evaluation of an Ethanolic Extract from Piquiá (*Caryocar villosum*) Pulp. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 16, n. 2, p. 268-271, 2013.

ANTONELLI-USHIROBIRA, T. M.; KANESHIMA, E. N.; GABRIEL, M.; AUDI, E. A.; MARQUES, L. C.; MELLO, J. C. P. Acute and subchronic toxicological evaluation of the semipurified extract of seeds of guaraná (*Paullinia cupana*) in rodents. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 48, n. 7, p. 1817-1820, 2010.

AZEVEDO, L.; ALVES DE LIMA, P. L.; GOMES, J. C.; STRINGHETA, P. C.; RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. F. Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) in vivo. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 45, n. 5, p. 852-858, 2007.

AZEVEDO, L.; GOMES, J. C.; STRINGHETA, P. C.; GONTIJO, Á. M. M. C.; PADOVANI, C. R.; RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F. Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 41, n. 12, p. 1671-1676, 2003.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. The essential comet assay: a comprehensive guide to measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, Berlim, v. 87, n. 6, p. 949-968, 2013.

AZQUETA, A.; MEIER, S.; PRIESTLEY, C.; GUTZKOW, K. B.; BRUNBORG, G.; SALLETTE, J.; SOUSSALINE, F.; COLLINS, A. The influence of scoring method on variability in results obtained with the comet assay. **Mutagenesis**, Oxford, v. 26, n. 3, p. 393-399, 2011.

BAGETTI, M.; FACCO, E. M. P.; PICCOLO, J.; HIRSCH, G. E.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.; KOBORI, C. N.; VIZZOTTO, M.; EMANUELLI, T. Physicochemical characterization and antioxidant capacity of pitanga fruits (*Eugenia uniflora* L.). **Food Science and Technology**, Campinas, v. 31, p. 147-154, 2011.

BARCELLOS, P. S.; SILVA, T. A. D.; CHAGAS, D. C. D.; NASCIMENTO, F. R. F.; GUERRA, R. N. M.; BARROQUEIRO, E. S. B. Avaliação bioquímica e toxicológica do extratos dos frutos de *Euterpe oleraceae* Martius (açai). **Revista de Ciências da Saúde**, São Luís, v. 12, n. 2, p. 91-96, 2010.

BEERS, R. F.; SIZER, I. W. A SPECTROPHOTOMETRIC METHOD FOR MEASURING THE BREAKDOWN OF HYDROGEN PEROXIDE BY CATALASE. **Journal of Biological Chemistry**, Rockville, v. 195, n. 1, p. 133-140, 1952.

BHATTACHARYA, A. L., R.A.; KRISHNAN, A.; ZAMAN, K.; DONGXU, S.; FERNANDES, G. Effect of dietary n-3 and n-6 oils with and without food restriction on activity of antioxidant enzymes and lipid peroxidation in livers of cyclophosphamide treated autoimmune-prone NZB/W female mice. **Journal of the American College of Nutrition**, Clearwater, v. 22, n. 5, p. 388-399, 2003.

BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, p. 123-130, 1999.

BICUDO, M.; RIBANI, R.; BETA, T. Anthocyanins, Phenolic Acids and Antioxidant Properties of Juçara Fruits (*Euterpe edulis* M.) Along the On-tree Ripening Process. **Plant Foods for Human Nutrition**, Dordrecht v. 69, n. 2, p. 142-147, 2014.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, W. P.; HOLLAND, N.; KIRSCH-VOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M. R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increased micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of cancer in humans. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2006.

BORGES, G. D. C.; VIEIRA, F. G. K.; COPETTI, C.; GONZAGA, L. V.; ZAMBIAZI, R. C.; MANCINI, J.; FETT, R. Chemical characterization, bioactive compounds, and antioxidant capacity of jussara (*Euterpe edulis*) fruit from the Atlantic Forest in southern Brazil. **Food Research International**, Guelph, v. 44, n. 7, p. 2128-2133, 2011.

BORGES, G. D. S. C.; GONZAGA, L. V.; JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J.; HELLER, M.; MICKE, G.; COSTA, A. C. O.; FETT, R. Protective effect of *Euterpe edulis* M. on Vero cell culture and antioxidant evaluation based on phenolic composition using HPLC - ESI-MS/MS. **Food Research International**, Guelph, v. 51, n. 1, p. 363-369, 2013.

BRASIL. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação-Geral da Política de Alimentação e Nutrição. **Guia alimentar para a população brasileira : promovendo a alimentação saudável**. Brasília: Ministério da Saúde, 2005. 236 p.

_____. **Atenção Primária e Promoção da Saúde**. Brasília: Conselho Nacional de Secretários da Saúde, 2007. 232 p.

_____. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. **Política Nacional de Promoção da Saúde**. 3 ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.

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

BURLINSON, B.; TICE, R. R.; SPEIT, G.; AGURELL, E.; BRENDLER-SCHWAAB, S. Y.; COLLINS, A. R.; ESCOBAR, P.; HONMA, M.; KUMARAVEL, T. S.; NAKAJIMA, M.; SASAKI, Y. F.; THYBAUD, V.; UNO, Y.; VASQUEZ, M.; HARTMANN, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 627, n. 1, p. 31-35, 2007.

BUTTERFIELD, D. A.; BADER LANGE, M. L.; SULTANA, R. Involvements of the lipid peroxidation product, HNE, in the pathogenesis and progression of Alzheimer's disease. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, Amsterdam, v. 1801, n. 8, p. 924-929, 2010.

CARVALHO, N. C. D.; CORRÊA-ANGELONI, M. J. F.; LEFFA, D. D.; MOREIRA, J.; NICOLAU, V.; AMARAL, P. D. A.; ROSSATTO, Â. E.; ANDRADE, V. M. D. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Melissa officinalis* in mice. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 34, p. 290-297, 2011.

CHACON, D. R.; LIBERA, A. N. D.; CINTRA, D. E. C.; CARVALHO, J. C. T.; OLIVEIRA, G. A. D.; MAISTRO, E. L. Absence of genotoxic and antigenotoxic effects of a standardized extract of the medicinal plant *Solanum melongena* on peripheral blood and bone marrow cells of Wistar rats. **Cytologia**, Tokyo, v. 67, n. 4, p. 417-422, 2002.

CHAPMAN, K.; SEWELL, F.; ALLAIS, L.; DELONGEAS, J.-L.; DONALD, E.; FESTAG, M.; KERVYN, S.; OCKERT, D.; NOGUES, V.; PALMER, H.; POPOVIC, M.; ROOSEN, W.; SCHOENMAKERS, A.; SOMERS, K.; STARK, C.; STEI, P.; ROBINSON, S. A global pharmaceutical company initiative: An evidence-based approach to define the upper limit of body weight loss in short term toxicity studies. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, New York, 2013. *In press*.

CHEN, A. Y.; CHEN, Y. C. A review of the dietary flavonoid, kaempferol on human health and cancer chemoprevention. **Food Chemistry**, Berlim, v. 138, n. 4, p. 2099-2107, 2013.

CHISTÉ, R. C.; FREITAS, M.; MERCADANTE, A. Z.; FERNANDES, E. The potential of extracts of *Caryocar villosum* pulp to scavenge reactive oxygen and nitrogen species. **Food Chemistry**, Berlim, v. 135, n. 3, p. 1740-1749, 2012.

CIMINO, M. C. Comparative overview of current international strategies and guidelines for genetic toxicology testing for regulatory purposes. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 362-390, 2006.

COLES, B. F.; KADLUBAR, F. F. Detoxification of electrophilic compounds by glutathione S-transferase catalysis: Determinants of individual response to chemical carcinogens and chemotherapeutic drugs? **BioFactors**, Amsterdam, v. 17, n. 1-4, p. 115-130, 2003.

COLLINS, A.; HARRINGTON, V. Antioxidants; not the only reason to eat fruit and vegetables. **Phytochemistry Reviews**, Amsterdam, v. 1, n. 2, p. 167-174, 2002.

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/DNA Repair**, Amsterdam, v. 336, n. 1, p. 69-77, 1995.

COLLINS, A. R.; DOBSON, V. L.; DUŠINSKÁ, M.; KENNEDY, G.; ŠTĚTINA, R. The comet assay: what can it really tell us? **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 375, n. 2, p. 183-193, 1997.

DAWN-LINSLEY, M.; EKINCI, F. J.; ORTIZ, D.; ROGERS, E.; SHEA, T. B. Monitoring thiobarbituric acid-reactive substances (TBARs) as an assay for oxidative damage in neuronal cultures and central nervous system. **Journal of Neuroscience Methods**, Amsterdam, v. 141, n. 2, p. 219-222, 2005.

DE AZEVEDO, M. B. M. N.; DE SOUZA LIMA, I. M.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. Antigenotoxicity of artemisinin in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, Philadelphia, v. 31, n. 8, p. 714-719, 2011.

DE BONT, R.; VAN LAREBEKE, N. Endogenous DNA damage in humans: a review of quantitative data. **Mutagenesis**, Oxford, v. 19, n. 3, p. 169-185, 2004.

DE BRITO, E. S.; DE ARAUJO, M. C.; ALVES, R. E.; CARKEET, C.; CLEVIDENCE, B. A.; NOVOTNY, J. A. Anthocyanins present in selected tropical fruits: acerola, jambolao, jussara, and guajiru. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 23, p. 9389-9394, 2007.

DE MELO, F. T.; DE OLIVEIRA, I. M.; GREGGIO, S.; DACOSTA, J. C.; GUECHEVA, T. N.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P.; ROSA, R. M. DNA damage in organs of mice treated acutely with patulin, a known mycotoxin. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 3548-3555, 2012.

DE SOUZA, V. R.; PEREIRA, P. A. P.; QUEIROZ, F.; BORGES, S. V.; DE DEUS SOUZA CARNEIRO, J. Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. **Food Chemistry**, Berlim, v. 134, n. 1, p. 381-386, 2012.

DEL BO', C.; RISO, P.; CAMPOLO, J.; MOLLER, P.; LOFT, S.; KLIMIS-ZACAS, D.; BRAMBILLA, A.; RIZZOLO, A.; PORRINI, M. A single portion of blueberry (*Vaccinium corymbosum* L) improves protection against DNA damage but not vascular function in healthy male volunteers. **Nutrition Research**, New York, v. 33, n. 3, p. 220-227, 2013.

DEVI, P. S.; KUMAR, M. S.; DAS, S. M. DNA Damage Protecting Activity and Free Radical Scavenging Activity of Anthocyanins from Red Sorghum (*Sorghum bicolor*) Bran. **Biotechnology Research International**, New York, v. 2012, 2012.

DÍAZ, A.; LOEWEN, P. C.; FITA, I.; CARPENA, X. Thirty years of heme catalases structural biology. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 525, n. 2, p. 102-110, 2012.

DOAK, S. H.; BRÜSEHAFFER, K.; DUDLEY, E.; QUICK, E.; JOHNSON, G.; NEWTON, R. P.; JENKINS, G. J. S. No-observed effect levels are associated with up-regulation of MGMT following MMS exposure. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 648, n. 1–2, p. 9-14, 2008.

DOS REIS, M. S.; FANTINI, A. C.; NODARI, R. O.; REIS, A.; GUERRA, M. P.; MANTOVANI, A. Management and Conservation of Natural Populations in Atlantic Rain Forest: The Case Study of Palm Heart (*Euterpe edulis* Martius). **Biotropica**, Washington, v. 32, n. 4b, p. 894-902, 2000.

DRAPER, H. H.; HADLEY, M. Malondialdehyde determination as index of lipid Peroxidation. **Methods in Enzymology**, New York, v. 186, p. 421-431, 1990.

ŘURAČKOVÁ, Z. Some current insights into oxidative stress. **Physiological Research**, Prague, v. 59, n. 4, p. 459-469, 2010.

EFSA. **Scientific opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment**. Parma: European Food Safety Authority Scientific Committee, 2011. Disponível em: <http://www.efsa.europa.eu/en/consultations/call/scaf110420.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2014.

ELHAJOUJI, A.; LUKAMOWICZ, M.; CAMMERER, Z.; KIRSCH-VOLDERS, M. Potential thresholds for genotoxic effects by micronucleus scoring. **Mutagenesis**, Swansea, v. 26, n. 1, p. 199-204, 2011.

ESTRUCH, R.; ROS, E.; SALAS-SALVADÓ, J.; COVAS, M.-I.; CORELLA, D.; ARÓS, F.; GÓMEZ-GRACIA, E.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; FIOL, M.; LAPETRA, J.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M.; SERRA-MAJEM, L.; PINTÓ, X.; BASORA, J.; MUÑOZ, M. A.; SORLÍ, J. V.; MARTÍNEZ, J. A.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. A. Primary Prevention of Cardiovascular Disease with a Mediterranean Diet. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 368, n. 14, p. 1279-1290, 2013.

FARIA, A. F.; MARQUES, M. C.; MERCADANTE, A. Z. Identification of bioactive compounds from jambolão (*Syzygium cumini*) and antioxidant capacity evaluation in different pH conditions. **Food Chemistry**, Berlim, v. 126, n. 4, p. 1571-1578, 2011.

FELZENSZWALB, I.; DA COSTA MARQUES, M. R.; MAZZEI, J. L.; AIUB, C. A. F. Toxicological evaluation of *Euterpe edulis*: A potential superfruit to be considered. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 58, n. 0, p. 536-544, 2013.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 455, n. 1-2, p. 81-95, 2000.

FESTING, M. F. W.; ALTMAN, D. G. Guidelines for the Design and Statistical Analysis of Experiments Using Laboratory Animals. **ILAR Journal**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 244-258, 2002.

FLEIG, F. D.; RIGO, S. M. Influência do tamanho dos frutos do Palmitreiro *Euterpe edulis* Mart. na germinação das sementes e crescimento das mudas. **Ciência Florestal**, Santa Maria, v. 8, n. 1, p. 35-41, 1998.

FORMAN, H. J.; ZHANG, H.; RINNA, A. Glutathione: Overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. **Molecular Aspects of Medicine**, Oxford, v. 30, n. 1-2, p. 1-12, 2009.

FRANKE, S. I. R.; PRÁ, D.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.; DA SILVA, J. Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: an in vivo analysis. **Mutagenesis**, Oxford, v. 20, n. 4, p. 279-283, 2005.

FU, D.; CALVO, J. A.; SAMSON, L. D. Balancing repair and tolerance of DNA damage caused by alkylating agents. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 12, n. 2, p. 104-120, 2012.

GALATI, G.; SABZEVARI, O.; WILSON, J. X.; O'BRIEN, P. J. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, Amsterdam, v. 177, n. 1, p. 91-104, 2002.

GALINDO-LEAL, C.; CÂMARA, I. D. G. **Status do hotspot Mata Atlântica: uma síntese**. In: *Mata Atlântica: Biodiversidade, Ameaças e Perspectivas*. 1 ed. Conservação Internacional: Belo Horizonte, 2005. Acesso em: 16 jul. 2012. Disponível em: <http://www.conservation.org.br/publicacoes/files/CapituloIStatusdoHotspotMataAtlantica.pdf>.

GLOVER, B. J.; MARTIN, C. Anthocyanins. **Current Biology**, Cambridge, v. 22, n. 5, p. R147-R150, 2012.

GONZÁLEZ-VALLINAS, M.; GONZÁLEZ-CASTEJÓN, M.; RODRÍGUEZ-CASADO, A.; RAMÍREZ DE MOLINA, A. Dietary phytochemicals in cancer prevention and therapy: a complementary approach with promising perspectives. **Nutrition Reviews**, Washington, v. 71, n. 9, p. 585-599, 2013.

GYORI, B. M.; VENKATACHALAM, G.; THIAGARAJAN, P. S.; HSU, D.; CLEMENT, M.-V. OpenComet: An automated tool for comet assay image analysis. **Redox Biology**, Amsterdam, v. 2, n. 0, p. 457-465, 2014.

HADI, S. M.; BHAT, S. H.; AZMI, A. S.; HANIF, S.; SHAMIM, U.; ULLAH, M. F. Oxidative breakage of cellular DNA by plant polyphenols: A putative mechanism for anticancer properties. **Seminars in Cancer Biology**, Philadelphia, v. 17, n. 5, p. 370-376, 2007.

HARASYM, J.; OLEDZKI, R. Effect of fruit and vegetable antioxidants on total antioxidant capacity of blood plasma. **Nutrition**, v. 30, n. 5, p. 511-517, 2014.

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

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

HARTREE, E. F. Determination of protein: A modification of the lowry method that gives a linear photometric response. **Analytical Biochemistry**, London, v. 48, n. 2, p. 422-427, 1972.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J. T.; GATEHOUSE, D. G.; ADLER, I.-D.; BLAKEY, D. H.; DERTINGER, S. D.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; SUTOU, S. In vivo rodent erythrocyte micronucleus assay. II. Some aspects of protocol design including repeated treatments, integration with toxicity testing, and automated scoring. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v. 35, n. 3, p. 234-252, 2000.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE JR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation Research Letters**, Amsterdam, v. 245, n. 4, p. 245-249, 1990.

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

HE, J.; GIUSTI, M. M. Anthocyanins: Natural Colorants with Health-Promoting Properties. **Annual Review of Food Science and Technology**, Palo Alto, v. 1, n. 1, p. 163-187, 2010.

HERNANDES, L. C.; AISSA, A. F.; ALMEIDA, M. R. D.; DARIN, J. D. A. C.; RODRIGUES, E.; BATISTA, B. L.; BARBOSA JÚNIOR, F.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. In vivo assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. **Food Research International**, Ottawa, v. 62, n. 0, p. 121-127, 2014.

HODNICK, W. F.; DUVAL, D. L.; PARDINI, R. S. Inhibition of mitochondrial respiration and cyanide-stimulated generation of reactive oxygen species by selected flavonoids. **Biochemical Pharmacology**, Hoboken, v. 47, n. 3, p. 573-580, 1994.

HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. **New England Journal of Medicine**, Waltham, v. 361, n. 15, p. 1475-1485, 2009.

HOLDEN, H. E.; MAJESKA, J. B.; STUDWELL, D. A direct comparison of mouse and rat bone marrow and blood as target tissues in the micronucleus assay. **Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 391, n. 1-2, p. 87-89, 1997.

HOU, D.-X.; KAI, K.; LI, J.-J.; LIN, S.; TERAHARA, N.; WAKAMATSU, M.; FUJII, M.; YOUNG, M. R.; COLBURN, N. Anthocyanidins inhibit activator protein 1 activity and cell transformation: structure–activity relationship and molecular mechanisms. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 25, n. 1, p. 29-36, 2004.

IBGE. Consumo alimentar médio per capita e percentual de consumo fora do domicílio em relação ao total consumido, por sexo, segundo os alimentos - Brasil - período 2008-2009. **Análise do Consumo Alimentar Pessoal no Brasil**. 2011. Disponível em: http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/condicaodevida/pof/2008_2009_analise_consumo/tabelas_pdf/tab_1_1.pdf. Acesso: 24 de abril de 2013.

ICH. **Guidance for Industry: S2 (R1) Genotoxicity testing and data interpretation for pharmaceuticals intended for human use** International Conference on Harmonization Expert Working Group, 2012. Disponível em: <http://www.fda.gov/downloads/Drugs/Guidances/ucm074931.pdf>. Acesso em: 26 mar. 2014.

IGARASHI, M.; NAGATA, M.; ITOH, S.; YAMOTO, T.; TSUDA, S. Relationship between DNA damage and micronucleus in mouse liver. **The Journal of Toxicological Sciences**, Sapporo, v. 35, n. 6, p. 881-889, 2010.

INÁCIO, M. R. C.; DE LIMA, K. M. G.; LOPES, V. G.; PESSOA, J. D. C.; DE ALMEIDA TEIXEIRA, G. H. Total anthocyanin content determination in intact açaí (*Euterpe oleracea* Mart.) and palmitero-juçara (*Euterpe edulis* Mart.) fruit using near infrared spectroscopy (NIR) and multivariate calibration. **Food Chemistry**, Barking, v. 136, n. 3–4, p. 1160-1164, 2013.

IPEMA. **O projeto Juçara**. Instituto de Permacultura e Ecovilas da Mata Atlântica, 2010. Disponível em: <<http://www.projetojuçara.org.br/o-projeto-juçara/>>. Acesso em: 26 jun. 2012.

JENKINS, G. J. S.; DOAK, S. H.; JOHNSON, G. E.; QUICK, E.; WATERS, E. M.; PARRY, J. M. Do dose response thresholds exist for genotoxic alkylating agents? **Mutagenesis**, Oxford, v. 20, n. 6, p. 389-398, 2005.

KAINA, B. Mechanisms and consequences of methylating agent-induced SCEs and chromosomal aberrations: a long road traveled and still a far way to go. **Cytogenetic and Genome Research**, Basel, v. 104, n. 1-4, p. 77-86, 2004.

KAINA, B.; ZIOUTA, A.; OCHS, K.; COQUERELLE, T. Chromosomal instability, reproductive cell death and apoptosis induced by O6-methylguanine in Mex-, Mex+ and methylation-tolerant mismatch repair compromised cells: facts and models. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 381, n. 2, p. 227-241, 1997.

KARIHTALA, P.; SOINI, Y. Reactive oxygen species and antioxidant mechanisms in human tissues and their relation to malignancies. **Acta Pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica**, Copenhagen, v. 115, n. 2, p. 81-103, 2007.

KATO, F. H.; VIANA, N. I.; SANTINI, C. B.; DE SOUZA, C. G. G.; VENEZIANI, R. C. S.; AMBRÓSIO, S. R.; TAVARES, D. C. Assessment of the in vitro and in vivo genotoxic and antigenotoxic effects of pimaradienoic acid in mammalian cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 749, n. 1-2, p. 87-92, 2012.

KENSLER, T. W. Chemoprevention by inducers of carcinogen detoxication enzymes. **Environmental health perspectives**, Durham, v. 105, n. Suppl 4, p. 965, 1997.

KHOURI, J.; RESCK, I. S.; POÇAS-FONSECA, M.; SOUSA, T. M. M.; PEREIRA, L. O.; OLIVEIRA, A. B. B.; GRISOLIA, C. K. Anticlastogenic potential and antioxidant effects of an aqueous extract of pulp from the pequi tree (*Caryocar brasiliense* Camb). **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v. 30, p. 442-448, 2007.

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

KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, Palo Alto, v. 44, n. 1, p. 239-267, 2004.

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

KRYSTON, T. B.; GEORGIEV, A. B.; PISSIS, P.; GEORGAKILAS, A. G. Role of oxidative stress and DNA damage in human carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 711, n. 1–2, p. 193-201, 2011.

LA VECCHIA, C. Mediterranean diet and cancer. **Public Health Nutrition**, Oxford, v. 7, n. 07, p. 965-968, 2004.

LAGOS, A. R.; MULLER, B. D. L. A. Hotspot brasileiro: Mata Atlântica. **Saúde & Ambiente em Revista**, Duque de Caxias, v. 2, n. 2, p. 35-45, 2007.

LAKO, J.; TRENERRY, V. C.; WAHLQVIST, M.; WATTANAPENPAIBOON, N.; SOTHEESWARAN, S.; PREMIER, R. Phytochemical flavonols, carotenoids and the antioxidant properties of a wide selection of Fijian fruit, vegetables and other readily available foods. **Food Chemistry**, Barking, v. 101, n. 4, p. 1727-1741, 2007.

LAZZÉ, M. C.; PIZZALA, R.; SAVIO, M.; STIVALA, L. A.; PROSPERI, E.; BIANCHI, L. Anthocyanins protect against DNA damage induced by tert-butyl-hydroperoxide in rat smooth muscle and hepatoma cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 535, n. 1, p. 103-115, 2003.

LEANDRO, L. F.; MUNARI, C. C.; SATO, V. L. F. L.; ALVES, J. M.; DE OLIVEIRA, P. F.; MASTROCOLA, D. F. P.; MARTINS, S. D. P. L.; MORAES, T. D. S.; DE OLIVEIRA, A. I.; TOZATTI, M. G.; CUNHA, W. R.; TAVARES, D. C. Assessment of the genotoxicity and antigenotoxicity of (+)-usnic acid in V79 cells and Swiss mice by the micronucleus and comet assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 753, n. 2, p. 101-106, 2013.

LEFFA, D. D.; ROSA, R. D.; MUNHOZ, B. P.; MELLO, A. D. A. M.; MANDELLI, F. D.; AMARAL, P. D. A.; ROSSATTO, Â. E.; ANDRADE, V. M. D. Genotoxic and Antigenotoxic Properties of *Calendula officinalis* Extracts in Mice Treated with Methyl Methanesulfonate. **Advances in Life Sciences**, v. 2, n. 2, p. 21-28, 2012.

LEITE-LEGATTI, A. V.; BATISTA, Â. G.; DRAGANO, N. R. V.; MARQUES, A. C.; MALTA, L. G.; RICCIO, M. F.; EBERLIN, M. N.; MACHADO, A. R. T.; DE CARVALHO-SILVA, L. B.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; PASTORE, G. M.; MARÓSTICA JÚNIOR, M. R. Jaboticaba peel: Antioxidant compounds, antiproliferative and antimutagenic activities. **Food Research International**, Ottawa, v. 49, n. 1, p. 596-603, 2012.

LIAO, W.; MCNUTT, M. A.; ZHU, W.-G. The comet assay: A sensitive method for detecting DNA damage in individual cells. **Methods**, v. 48, n. 1, p. 46-53, 2009.

LIMÓN-PACHECO, J.; GONSEBATT, M. E. The role of antioxidants and antioxidant-related enzymes in protective responses to environmentally induced oxidative stress. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 674, n. 1–2, p. 137-147, 2009.

LIPS, J.; KAINA, B. Repair of O6-methylguanine is not affected by thymine base pairing and the presence of MMR proteins. **Mutation Research/DNA Repair**, Amsterdam, v. 487, n. 1–2, p. 59-66, 2001.

LORD, C. J.; ASHWORTH, A. The DNA damage response and cancer therapy. **Nature**, London, v. 481, n. 7381, p. 287-294, 2012.

LORENZI, H.; SOUZA, H. M. D.; COSTA, J. T. D. M.; CERQUEIRA, L. S. C. D.; FERREIRA, E. **Palmeiras brasileiras e exóticas cultivadas**. 1 Nova Odessa: Instituto Plantarum, 2004.

LU, S. C. Glutathione synthesis. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1830, n. 5, p. 3143-3153, 2013.

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; TICE, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 189, n. 2, p. 103-112, 1987.

MEIRA, L. B.; MOROSKI-ERKUL, C. A.; GREEN, S. L.; CALVO, J. A.; BRONSON, R. T.; SHAH, D.; SAMSON, L. D. Aag-initiated base excision repair drives alkylation-induced retinal degeneration in mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 3, p. 888-893, 2009.

MIADOKOVA, E.; CHALUPA, I.; VLCKOVA, V.; SEVCOVICOVA, A.; NADOVA, S.; KOPASKOVA, M.; HERCEGOVA, A.; GASPEROVA, P.; ALFOLDIOVA, L.; KOMJATIOVA, M.; CSANYIOVA, Z.; GALOVA, E.; CELLAROVA, E.; VLCEK, D. Genotoxicity and antigenotoxicity evaluation of non-photoactivated hypericin. **Phytotherapy Research**, Malden, v. 24, n. 1, p. 90-95, 2010.

MICCADEI, S.; KYLE, M. E.; GILFOR, D.; FARBER, J. L. Toxic consequence of the abrupt depletion of glutathione in cultured rat hepatocytes. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 265, n. 2, p. 311-320, 1988.

MIZUMOTO, K.; GLASCOTT JR, P. A.; FARBER, J. L. Roles for oxidative stress and poly(ADP-ribosyl)ation in the killing of cultured hepatocytes by methyl methanesulfonate. **Biochemical Pharmacology**, Hoboken, v. 46, n. 10, p. 1811-1818, 1993.

MORRIS, D.; KHURASANY, M.; NGUYEN, T.; KIM, J.; GUILFORD, F.; MEHTA, R.; GRAY, D.; SAVIOLA, B.; VENKETARAMAN, V. Glutathione and infection. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1830, n. 5, p. 3329-3349, 2013.

MUNARI, C. C.; DE OLIVEIRA, P. F.; DE SOUZA LIMA, I. M.; DE PAULA LIMA MARTINS, S.; DE CARVALHO DA COSTA, J.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. Evaluation of cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of Solanum lycocarpum fruits glicoalkaloid extract in V79 cells. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 50, n. 10, p. 3696-3701, 2012.

MURATA, M.; THANAN, R.; MA, N.; KAWANISHI, S. Role of Nitrate and Oxidative DNA Damage in Inflammation-Related Carcinogenesis. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**, Cairo, v. 2012, 2012.

NETO, M. D. A. B. M.; DE SOUZA LIMA, I. M.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. Antigenotoxicity of artemisinin in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 31, n. 8, p. 714-719, 2011.

NIKI, E. Lipid peroxidation: Physiological levels and dual biological effects. **Free Radical in Biology and Medicine**, Oxford, v. 47, n. 5, p. 469-484, 2009.

_____. Biomarkers of lipid peroxidation in clinical material. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, Amsterdam, v. 1840, n. 2, p. 809-817, 2014.

OECD. Test Guideline No. 473. **Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test**. Paris: OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 1997. Disponível em: <http://www.oecd.org/chemicalsafety/risk-assessment/1948442.pdf>. Acesso em: 27 mar. 2014.

OLFERT, E. D.; CROSS, B. M.; MCWILLIAM, A. A. **Guide to the care and use of experimental animals**. 2 ed. Ottawa: Canadian Council on Animal Care, 1993. Disponível em: http://www.ccac.ca/Documents/Standards/Guidelines/Experimental_Animals_Vol1.pdf. Acesso em: 24 set. 2012.

OLIVEIRA, P. F.; NETO, M. A. B. M.; LEANDRO, L. F.; BASTOS, J. K.; DA SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C. In Vivo Antigenotoxicity of Baccharin, an Important Constituent of *Baccharis dracunculifolia* DC (Asteraceae). **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, Copenhagen, v. 109, n. 1, p. 35-41, 2011.

OLIVEIRA, P. F. D.; ACÉSIO, N. O.; LEANDRO, L. F.; CUNHA, N. L.; UCHÔA, C. J. D. M.; JANUÁRIO, A. H.; TAVARES, D. C. Antigenotoxicity of *Roupala montana* extract in the mouse micronucleus and comet assays. **Drug and Chemical Toxicology**, New York, v. 37, n. 1, p. 93-99, 2013.

ORTEGA, R. Importance of functional foods in the Mediterranean diet. **Public Health Nutrition**, Wallingford, v. 9, n. 8A, p. 1136-1140, 2006.

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

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, San Diego, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PALUDO, G. F.; SILVA, J. Z. D.; REIS, M. S. D. Estimativas de produção de frutos de palmito (Euterpe edulis Mart.) a partir da densidade de indivíduos. **Biodiversidade Brasileira**, n. 2, p. 92-102, 2012.

PANDEY, K. B.; RIZVI, S. I. Plant Polyphenols as Dietary Antioxidants in Human Health and Disease. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, Austin, v. 2, n. 5, 2009.

PASCUAL-TERESA, S.; SANCHEZ-BALLESTA, M. Anthocyanins: from plant to health. **Phytochemistry Reviews**, Dordrecht, v. 7, n. 2, p. 281-299, 2008.

PELUCCHI, C.; BOSETTI, C.; ROSSI, M.; NEGRI, E.; LA VECCHIA, C. Selected Aspects of Mediterranean Diet and Cancer Risk. **Nutrition and Cancer**, Chichester, v. 61, n. 6, p. 756-766, 2009.

PFEIFER, G. P.; BESARATINIA, A. UV wavelength-dependent DNA damage and human non-melanoma and melanoma skin cancer. **Photochemical & Photobiological Sciences**, Cambridge, v. 11, n. 1, p. 90-97, 2012.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. **Fitoterapia**, Amsterdam, v. 82, n. 4, p. 513-523, 2011.

RAHMAN, M. M.; ICHIYANAGI, T.; KOMIYAMA, T.; HATANO, Y.; KONISHI, T. Superoxide radical- and peroxynitrite-scavenging activity of anthocyanins; structure-activity relationship and their synergism. **Free Radical Research**, London, v. 40, n. 9, p. 993-1002, 2006.

RAMASSAMY, C. Emerging role of polyphenolic compounds in the treatment of neurodegenerative diseases: a review of their intracellular targets. **European Journal of Pharmacology**, Amsterdam, v. 545, n. 1, p. 51-64, 2006.

RAMOS-ESCUADERO, F.; MUÑOZ, A. M.; ALVARADO-ORTÍZ, C.; ALVARADO, Á.; YÁÑEZ, J. A. Purple corn (*Zea mays* L.) phenolic compounds profile and its assessment as an agent against oxidative stress in isolated mouse organs. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 15, n. 2, p. 206-215, 2012.

RASHID, K.; SINHA, K.; SIL, P. C. An update on oxidative stress-mediated organ pathophysiology. **Food and Chemical Toxicology**, Oxford, v. 62, n. 0, p. 584-600, 2013.

RAVISHANKAR, D.; RAJORA, A. K.; GRECO, F.; OSBORN, H. M. I. Flavonoids as prospective compounds for anti-cancer therapy. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Amsterdam, v. 45, n. 12, p. 2821-2831, 2013.

RIBEIRO, J. C.; ANTUNES, L. M. G.; AISSA, A. F.; DARIN, J. D. A. C.; DE ROSSO, V. V.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. D. L. P. 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/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 695, n. 1-2, p. 22-28, 2010.

RIBEIRO, L. D. O.; MENDES, M. F.; PEREIRA, C. D. S. S. Avaliação da Composição Centesimal, Mineral e Teor de Antocianinas da polpa de juçará (*Euterpe edulis* Martius). **Revista Eletrônica TECEN**, Vassouras, v. 4, n. 2, p. 5-16, 2011.

RIBEIRO, L. R. **Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo***
In: L. R. RIBEIRO, D. M. F. SALVADORI and E. K. MARQUES. Mutagênese Ambiental. 1 ed. Ulbra: Canoas, 2003. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*, 201-219.

ROSA, R. M.; HOCH, N. C.; FURTADO, G. V.; SAFFI, J.; HENRIQUES, J. A. P. DNA damage in tissues and organs of mice treated with diphenyl diselenide. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 633, n. 1, p. 35-45, 2007.

ROTHFUSS, A.; HONMA, M.; CZICH, A.; AARDEMA, M. J.; BURLINSON, B.; GALLOWAY, S.; HAMADA, S.; KIRKLAND, D.; HEFLICH, R. H.; HOWE, J.; NAKAJIMA, M.; O'DONOVAN, M.; PLAPPERT-HELBIG, U.; PRIESTLEY, C.; RECIO, L.; SCHULER, M.; UNO, Y.; MARTUS, H.-J. Improvement of *in vivo* genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 723, n. 2, p. 108-120, 2011.

SALAS-SALVADÓ, J.; BULLÓ, M.; BABIO, N.; MARTÍNEZ-GONZÁLEZ, M. Á.; IBARROLA-JURADO, N.; BASORA, J.; ESTRUCH, R.; COVAS, M. I.; CORELLA, D.; ARÓS, F.; RUIZ-GUTIÉRREZ, V.; ROS, E.; INVESTIGATORS, F. T. P. S. Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes With the Mediterranean Diet: Results of the PREDIMED-Reus nutrition intervention randomized trial. **Diabetes Care**, New York, v. 34, n. 1, p. 14-19, 2011.

SANG, S. Bioavailability and metabolism of bioactive food components. **Journal of Functional Foods**, Amsterdam, v. 7, n. 0, p. 1-2, 2014.

SARKAR, B.; KUMAR, D.; SASMAL, D.; MUKHOPADHYAY, K. Antioxidant and DNA damage protective properties of anthocyanin-rich extracts from Hibiscus and Ocimum: a comparative study. **Natural Product Research**, London, p. 1-6, 2014.

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

SCHANZ, S.; SCHULER, N.; LORAT, Y.; FAN, L.; KAESTNER, L.; WENNEMUTH, G.; RÜBE, C.; RÜBE, C. E. Accumulation of DNA damage in complex normal tissues after protracted low-dose radiation. **DNA Repair**, Amsterdam, v. 11, n. 10, p. 823-832, 2012.

SCHAUSS, A. G.; CLEWELL, A.; BALOGH, L.; SZAKONYI, I. P.; FINANCSEK, I.; HORVÁTH, J.; THUROCZY, J.; BÉRES, E.; VÉRTESI, A.; HIRKA, G. Safety evaluation of an açai-fortified fruit and berry functional juice beverage (MonaVie Active®). **Toxicology**, Amsterdam, v. 278, n. 1, p. 46-54, 2010.

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

SEDLAK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein-bound, and nonprotein sulfhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. **Analytical Biochemistry**, London, v. 25, n. 0, p. 192-205, 1968.

SELLERS, R. S.; MORTAN, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J. K.; YANO, B. L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology Position Paper: Organ Weight Recommendations for Toxicology Studies. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 35, n. 5, p. 751-755, 2007.

SENTELLAS, S.; MORALES-IBANEZ, O.; ZANUY, M.; ALBERTÍ, J. J. GSSG/GSH ratios in cryopreserved rat and human hepatocytes as a biomarker for drug induced oxidative stress. **Toxicology in Vitro**, Oxford, v. 28, n. 5, p. 1006-1015, 2014.

SERPELONI, J.; GROTTTO, D.; MERCADANTE, A.; DE LOURDES PIRES BIANCHI, M.; ANTUNES, L. Lutein improves antioxidant defense in vivo and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 84, n. 10, p. 811-822, 2010.

SERPELONI, J. M.; GROTTTO, D.; AISSA, A. F.; MERCADANTE, A. Z.; BIANCHI, M. D. L. P.; ANTUNES, L. M. G. An evaluation, using the comet assay and the micronucleus test, of the antigenotoxic effects of chlorophyll b in mice. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 725, n. 1-2, p. 50-56, 2011.

SHIH, P.-H.; YEH, C.-T.; YEN, G.-C. Anthocyanins Induce the Activation of Phase II Enzymes through the Antioxidant Response Element Pathway against Oxidative Stress-Induced Apoptosis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 55, n. 23, p. 9427-9435, 2007.

SILVA, M. G. C. P. C.; BARRETO, W. S.; SERÔDIO, M. H. **Comparação nutricional da polpa dos frutos de juçara e de açai**. Ministério da Agricultura, Agropecuária e Abastecimento. Centro de Pesquisa do Cacau - Ceplac, 2004. Acesso em: <http://www.ceplac.gov.br>. Acesso em: 19 mar. 2014.

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

SIRTORI, C. R.; GALLI, C.; ANDERSON, J. W.; SIRTORI, E.; ARNOLDI, A. Functional foods for dyslipidaemia and cardiovascular risk prevention. **Nutrition Research Reviews**, Cambridge, v. 22, n. 02, p. 244-261, 2009.

STEINKELLNER, H.; RABOT, S.; FREYWALD, C.; NOBIS, E.; SCHARF, G.; CHABICOVSKY, M.; KNASMÜLLER, S.; KASSIE, F. Effects of cruciferous vegetables and their constituents on drug metabolizing enzymes involved in the bioactivation of DNA-reactive dietary carcinogens. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 480–481, n. 0, p. 285-297, 2001.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. **Current Protocols in Immunology**, New York, v. 21, n. 3B, p. A.3B.1-A.3B.2, 2001.

SWENBERG, J. A.; LU, K.; MOELLER, B. C.; GAO, L.; UPTON, P. B.; NAKAMURA, J.; STARR, T. B. Endogenous versus Exogenous DNA Adducts: Their Role in Carcinogenesis, Epidemiology, and Risk Assessment. **Toxicological Sciences**, Cary, v. 120, n. suppl 1, p. S130-S145, 2011.

THAKUR, V.; DEB, G.; BABCOOK, M.; GUPTA, S. Plant Phytochemicals as Epigenetic Modulators: Role in Cancer Chemoprevention. **The AAPS Journal**, Arlington, v. 16, n. 1, p. 151-163, 2014.

THUKRAL, S. K.; NORDONE, P. J.; HU, R.; SULLIVAN, L.; GALAMBOS, E.; FITZPATRICK, V. D.; HEALY, L.; BASS, M. B.; COSENZA, M. E.; AFSHARI, C. A. Prediction of Nephrotoxicant Action and Identification of Candidate Toxicity-Related Biomarkers. **Toxicologic Pathology**, Thousand Oaks, v. 33, n. 3, p. 343-355, 2005.

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

TSUDA, T. Dietary anthocyanin-rich plants: Biochemical basis and recent progress in health benefits studies. **Molecular Nutrition & Food Research**, Weinheim, v. 56, n. 1, p. 159-170, 2012.

TSUKAMOTO, A. A. F.; MACEDO, R. L. G.; VENTURIN, N.; R, M. A. Aspectos fisiológicos e silviculturais do palmitero (*Euterpe edulis* Martius) plantado em diferentes tipos de consórcios no município de Lavras, MG. **Revista Cerne**, v. 7, n. 1, 2001.

ULUTAŞ, O.; YILDIZ, N.; DURMAZ, E.; AHBAB, M.; BARLAS, N.; ÇOK, İ. An in vivo assessment of the genotoxic potential of bisphenol A and 4-tert-octylphenol in rats. **Archives of Toxicology**, Berlin, v. 85, n. 8, p. 995-1001, 2011.

VALKO, M.; LEIBFRITZ, D.; MONCOL, J.; CRONIN, M. T. D.; MAZUR, M.; TELSER, J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, Exeter, v. 39, n. 1, p. 44-84, 2007.

VALKO, M.; RHODES, C. J.; MONCOL, J.; IZAKOVIC, M.; MAZUR, M. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, Amsterdam, v. 160, n. 1, p. 1-40, 2006.

VAN DE WATER, B.; ZOETEWIJ, J. P.; NAGELKERKE, J. F. Alkylation-Induced Oxidative Cell Injury of Renal Proximal Tubular Cells: Involvement of Glutathione Redox-Cycle Inhibition. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 327, n. 1, p. 71-80, 1996.

VASCONCELOS, S. M. L.; GOULART, M. O. F.; MOURA, J. B. D. F.; MANFREDINI, V.; BENFATO, M. D. S.; KUBOTA, L. T. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, p. 1323-1338, 2007.

VASQUEZ, M. Z. Recommendations for safety testing with the in vivo comet assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, Amsterdam, v. 747, n. 1, p. 142-156, 2012.

VIEIRA, P. M.; COSTA, P. M.; RIBEIRO E SILVA, C.; CHEN-CHEN, L. Assessment of the genotoxic, antigenotoxic, and cytotoxic activities of the ethanolic fruit extract of *Solanum lycocarpum* A. St. Hill. (Solanaceae) by micronucleus test in mice. **Journal of Medicinal Food**, Larchmont, v. 13, n. 6, p. 1409-1414, 2010.

WANG, L. S.; STONER, G. D. Anthocyanins and their role in cancer prevention. **Cancer Letters**, Amsterdam, v. 269, n. 2, p. 281-290, 2008.

WANG, S. Y.; JIAO, H. Scavenging capacity of berry crops on superoxide radicals, hydrogen peroxide, hydroxyl radicals, and singlet oxygen. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 48, n. 11, p. 5677-5684, 2000.

WEST, J. D.; MARNETT, L. J. Endogenous Reactive Intermediates as Modulators of Cell Signaling and Cell Death. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 19, n. 2, p. 173-194, 2006.

WOLFSEGGER, M. J.; JAKI, T.; DIETRICH, B.; KUNZLER, J. A.; BARKER, K. A note on statistical analysis of organ weights in non-clinical toxicological studies. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 240, n. 1, p. 117-122, 2009.

WU, X.; PRIOR, R. L. Systematic identification and characterization of anthocyanins by HPLC-ESI-MS/MS in common foods in the United States: fruits and berries. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Washington, v. 53, n. 7, p. 2589-2599, 2005.

WYATT, M. D.; PITTMAN, D. L. Methylating Agents and DNA Repair Responses: Methylated Bases and Sources of Strand Breaks. **Chemical Research in Toxicology**, New York, v. 19, n. 12, p. 1580-1594, 2006.

YANG, J.-L.; CHAO, J.-I.; LIN, J.-G. Reactive Oxygen Species May Participate in the Mutagenicity and Mutational Spectrum of Cadmium in Chinese Hamster Ovary-K1 Cells. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v. 9, n. 8, p. 1360-1367, 1996.

ZENG, Y.-W.; YANG, J.-Z.; PU, X.-Y.; DU, J.; YANG, T.; YANG, S.-M.; ZHU, W.-H. Strategies of functional food for cancer prevention in human beings. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, Bangkok, v. 14, n. 3, p. 1585-1592, 2013.

Anexo

ANEXO



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus de Ribeirão Preto
Comissão de Ética no Uso de Animais

CERTIFICADO

Certificamos que o trabalho (Protocolo nº 12.1.1606.53.4), intitulado "Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e antigenotoxicidade do Fruto da Palmeira Juçara (*Euterpe edulis Martius*) em Ratos Wistar", de autoria de **Bruno Franco Fernandes Barbosa** e de **Maria de Lourdes Pires Bianchi**, 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 05.11.2012.

Colaboradores: Lusânia Maria Greggi Antunes;
Andiara Zerlotti Mercadante;
Regislaine Valéria Burim;
Joana D'Arc Castania Darin;
Jefferson Leandro Codognotto;
Lilian Regina Barros Mariutti;
Mara Ribeiro de Almeida;
Vinícius de Paula Venâncio

This is to certify that the work (Protocol number 12.1.1606.53.4), entitled: "Citotoxicity, Genotoxicity and Antigenotoxicity Evaluation of Juçara Palm Fruit (*Euterpe edulis Martius*) in Wister Rats", by **Bruno Franco Fernandes Barbosa** and **Maria de Lourdes Pires Bianchi**, is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimentation adopted by Ethic Commission for the Use of Animals (CEUA) of the *Campus* of Ribeirão Preto – USP, and was approved in the meeting, November 5, 2012.

Ribeirão Preto, 13 de novembro de 2012.

Presidente da CEUA
Profa.Dra. Claudia Maria Padovan

Secretária da CEUA
Maria Angélica Depiro