



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ - UNIFAP
PRÓREITORIA DE PESQUISA E PÓS GRADUAÇÃO
MESTRADO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

ALAN BRUNO AURÉLIO CARNEIRO

**OBTENÇÃO DO ÓLEO DA *Astrocaryum aculeatum* (TUCUMÃ) E SUA
AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E/OU ANTIGENOTÓXICA *IN VIVO* COM
TRATAMENTO AGUDO EM CAMUNDONGO *swiss*.**

**MACAPÁ
2017**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ - UNIFAP

OBTENÇÃO DO ÓLEO DA *Astrocaryum aculeatum* (TUCUMÃ) E SUA AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E/OU ANTIGENOTÓXICA *IN VIVO* COM TRATAMENTO AGUDO EM CAMUNDONGO *swiss*.

Dissertação para o programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Amapá para defesa de Mestrado.

Área de Concentração: Ensaios Biológicos

Aluno: Alan Bruno Aurélio Carneiro

Orientador: Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto.

MACAPÁ

2017
FOLHA DE APROVAÇÃO

ALAN BRUNO AURÉLIO CARNEIRO

**OBTENÇÃO DO ÓLEO DA *Astrocaryum aculeatum* (TUCUMÃ) E SUA
AVALIAÇÃO GENOTÓXICA E/OU ANTIGENOTÓXICA *IN VIVO* COM
TRATAMENTO AGUDO EM CAMUNDONGO *swiss*.**

Aprovado em: Macapá, _____ de _____ de 2017.

PRESIDENTE: _____.

Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto
Universidade Federal do Amapá

TITULAR 1: _____.

Prof^a. Dr^a. Deyse de Souza Dantas
Universidade Federal do Amapá

TITULAR 2: _____.

Prof. Dr. Madson Ralide Fonseca Gomes
Universidade Federal do Amapá

TITULAR 3: _____.

Prof. Dr. Pablo Abdon da Costa Francez
Estácio – AP/POLITEC – AP

**MACAPÁ
2017**

“**DEDICO** esta conquista a meus pais que me ensinaram desde cedo o valor da busca pelo conhecimento”.

AGRADECIMENTOS

Gostaria antes de tudo, deixar meu profundo agradecimento a professora Analizia Pena da Silva, que me orientou na construção de um projeto de pesquisa para o processo seletivo deste mestrado mesmo enfrentando uma perda muito difícil na família e sem hesitar continuou a me ajudar, num ato puramente altruísta e desprovido de quaisquer interesse que não o de um professor que busca impulsionar seu aluno para o sucesso. Deixo aqui minha profunda gratidão e admiração a você professora.

Agradeço muito, minha grande colega do tempo de faculdade Margareth Campos e minha eterna e querida amiga a quem tenho enorme carinho, Kely Martins, que diga-se de passagem é uma flor, pois ambas me ajudaram a reunir documentação necessária me enviando em tempo hábil para que eu pudesse me destacar no processo seletivo para ingresso no programa deste mestrado em ciências da saúde.

Foi uma jornada difícil, porém cumprida com otimismo. Aqui aprendi que pesquisa se faz com companheirismo, e por isso, não poderia deixar de agradecer aos meus colegas de pesquisa do Grupo de Pesquisa em Ciências Biológicas (GPCBIO), em especial ao Eduardo Serrão e Ivagner Pereira e parabenizar meu orientador Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto, por ter me guiado nessa jornada, bem como pela iniciativa e construção do GPCBIO. Parabéns professor!

Meus horários de trabalho, durante essa caminhada, se mostraram ser enormes obstáculos, todavia foram superados, pois tinha a meu lado pessoas amigas e companheiras como o Amaury Barros e a Jordana Maia que no trabalho, me ofereceram suporte imprescindível para esta conquista.

Esta trajetória foi marcada por uma fase profundamente difícil em minha vida, e foi aqui que eu pude constatar, o que eu já sabia, o quanto sou abençoado por ter os melhores pais que um filho poderia ter, pois me apoiaram incondicionalmente de modo que meu sucesso sem este apoio não seria possível. Então a meu pai João Batista Carneiro de Araújo e a minha mãe Jurandir Aurélio de Araújo, deixo aqui registrado meu profundo orgulho de ser filho de vocês.

Registro aqui também, minha gratidão a minha irmã Alinne Aurélio Carneiro que apesar de frequentemente discordar de minhas opiniões, considero ser a pessoa que melhor me compreende no mundo, e para mim, é sempre bom falar com alguém assim, principalmente em momentos difíceis. É claro agradecer a importante influência exercida pelo meu irmão Alan Diêgo Aurélio Carneiro, em mim, por simplesmente ser um grande exemplo de jovem pesquisador, seu exemplo me inspira.

Enfim, em resumo, foi um período atribulado e importante na minha vida, e que sempre lembrarei com muito carinho, pois foi durante a essa minha busca pelo de título de mestre em ciências da saúde que conquistei a mulher da minha vida Bruna Teixeira de Sá, a mulher mais maravilhosa que um homem poderia querer, e que me deu, neste mesmo período, uma linda filha, Nicole de Sá Carneiro, hoje com quase 1 aninho e 3 meses e um lindo filho Arthur de Sá Carneiro, hoje com quase 2 meses. Portanto tenho muito a agradecer a essa fase da minha vida, pois mais do que Mestre, me tornei Marido, Pai e acredito que tudo isso fez de mim uma pessoa melhor.

“O aprendizado é impossível sem o direito de errar e sem uma longa tolerância para com o estado de dúvida. Mais ainda: não é possível o sujeito orientar-se no meio de uma controvérsia sem conceder a ambos os lados uma credibilidade inicial sem reservas, sem medo, sem a mínima prevenção interior, por mais oculta que seja. Só assim a verdade acabará aparecendo por si mesma. O verdadeiro homem da ciência aposta sempre em todos os cavalos, e aplaude incondicionalmente o vencedor, qualquer que seja. A isenção não é desinteresse, distanciamento frio: é paixão pela verdade desconhecida, é amor à ideia mesma da verdade, sem pressupor qual seja o conteúdo dela em cada caso particular.”

Olavo de Carvalho.

RESUMO

Obtenção do óleo fixo da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) e sua avaliação genotóxica e/ou antigenotóxica *in vivo* com tratamento agudo em camundongo swiss.

Alan Bruno Aurélio Carneiro; Brenda Fernandez Conrado; Eduardo Serrão Pinto; Ivagner Ferreira Ribeiro ; Mayck Rian Gonçalves Magalhães; Paulo Henrique Souza da Silva; Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto.

A *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã), é uma fruta nativa da Amazônia rica em carotenoides e polifenóis, desta forma, o presente estudo teve como objetivo a obtenção do óleo fixo da *Astrocaryum aculeatum* e sua avaliação genotóxica e/ou antigenotóxica *in vivo* com tratamento agudo em camundongo swiss. A metodologia empregada, o fruto foi seco, descascado e sua poupa ficou em estufa por 50° por 24h e resfriada por temperatura ambiente, sendo a massa resultante de 28,21% do total de poupa, sendo submetido a prensagem hidráulica obtendo-se 22,21% do óleo. Utilizou-se animais (machos - 6 por grupo) que receberam por gavagem o óleo nas concentrações 500, 1000 e 2000 mg/kg p.c. (grupos genotóxicos); e associadas a Doxorubicina - DXR intraperitonealmente na concentração de 15 mg/kg p.c. (grupos antigenotóxicos). O dimetilsufóxido - DMSO, solvente utilizado, foi avaliado isoladamente para exclusão de possível influência nos resultados. Todos os grupos foram feitas análises das lamínas a partir de esfregaços com sangue periférico, sendo este coletado 24h e 48h após os devidos tratamentos, onde se analisou 2000 células por animal. **Resultados e Discussão:** Os grupos genotóxicos não demonstraram diferenças estatisticamente significativas em relação ao controle negativo, e em relação ao teste antigenotóxico houve diferença estatisticamente significativa para todas as concentrações utilizadas em relação ao grupo controle positivo (DXR) sendo que houve redução significativa de cerca $36,57 \pm 1,74\%$ para os tratamentos de 24h, e de $65,18 \pm 1,29\%$ para os de 48h, na frequência de PCEMNs. **Conclusão:** O AA apresentou relevante efeito antigenotóxico, e ausência de efeito genotóxico, para todas as concentrações utilizadas tanto em 24h e 48h.

Palavras Chaves: *Astrocaryum aculeatum*; Micronúcleo; Tucumã; Genotoxicidade.

ABSTRACT

Obtaining the fixed oil of *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) and its genotoxic and/or antigenotoxic evaluation *in vivo* with acute treatment in swiss mice.

Alan Bruno Aurélio Carneiro; Brenda Fernandez Conrado; Eduardo Serrão Pinto; Ivagner Ferreira Ribeiro ; Mayck Rian Gonçalves Magalhães; Paulo Henrique Souza da Silva; Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto.

Astrocaryum aculeatum (Tucumã), is a native Amazon fruit rich in carotenoids and polyphenols. In this way, the present study aimed to obtain the fixed oil of *Astrocaryum aculeatum* and its genotoxic and/or antigenotoxic evaluation *in vivo* with acute treatment in Swiss mouse. The methodology was used, the fruit was dried, peeled and stored in a greenhouse for 50° per 24h and cooled by room temperature. The resulting mass was 28.21% of the total of the fruit, being subjected to hydraulic pressing, obtaining 22, 21% of the oil. Animals (males - 6 per group) were used to gavage the oil at concentrations of 500, 1000 and 2000 mg / kg b.p. (Genotoxic groups); And Doxorubicin-DXR-associated intraperitoneally at the concentration of 15 mg / kg b.p. (Antigenotoxic groups). Dimethylsulfoxide-DMSO, the solvent used, was evaluated in isolation to exclude possible influence on the results. All groups were analyzed from the laminae from smears with peripheral blood, which was collected 24h and 48h after the appropriate treatments, where 2000 cells per animal were analyzed. Results and Discussion: The genotoxic groups did not show statistically significant differences in relation to the negative control, and in relation to the antigenotoxic test there was a statistically significant difference for all the concentrations used in relation to the positive control group (DXR), with a significant reduction of about 36 , 57 ± 1.74% for treatments of 24h and 65,18 ± 1,29% for those of 48h, in the frequency of PCEMNs. Conclusion: The AA presented a relevant antigenotoxic effect, and no genotoxic effect, for all the concentrations used in both 24h and 48h.

Keywords: *Astrocaryum aculeatum*; Micronucleus; Tucumã; Genotoxicity.

LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AA – Óleo Fixo da *Astrocaryum aculeatum*

AA I – Óleo Fixo da *Astrocaryum aculeatum* (500mg/kg p. c.)

AA II – Óleo Fixo da *Astrocaryum aculeatum* (1.000mg/kg p. c.)

AA III – Óleo Fixo da *Astrocaryum aculeatum* (2.000mg/kg p. c.)

ANOVA – Análise de Variância

CEMIB – Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica

CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

DMSO – Dimetilsulfóxido

DXR – Doxorubicina

ERA – Atividade Equivalente de Retinol (Retinol Activity Equivalent)

EROs – Espécies Reativas de Oxigênio

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IDN – Índice de Divisão Nuclear

M – Machos

NCEs – Eritrócitos Normocromáticos

O_2^- - Radical superóxido

$O_2^{\cdot-}$ - Ânion superóxido

OH – Radical Hidroxil

PCE – Eritrócitos Policromáticos

PCEMNs - Eritrócitos Policromáticos Miconucleados

UNICAMP – Universidade Estadual de Campinas

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Palmeira da família das Arecaceae.....	21
Figura 02 – <i>Astrocaryum aculeatum</i>	22
Figura 03 – Flavonóides. Estrutura básica e tipos.....	29
Figura 04 – Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro.....	32
Figura 05 – Fluxograma do processo de obtenção do óleo fixo do tucumã, por prensagem hidráulica.....	37
Figura 06 – Eritrócito policromático micronucleado.....	44

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 01 – Comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) entre as células de medula óssea e sangue periférico de 24h de camundongos Swiss tratados com diferentes doses de AA e/com/ou DXR, e seus respectivos controles..... 52
- Gráfico 02 – Comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) entre as células de medula óssea e sangue periférico de 48h de camundongos Swiss tratados com diferentes doses de AA e/com/ou DXR, e seus respectivos controles..... 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Valores morfométricos de estudos realizados com o Tucumã.....	22
Tabela 02 – Composição bioquímica do Tucumã em 100g.....	23
Tabela 03 – Principais compostos de ácidos graxos no óleo de tucumã.....	23
Tabela 04 – Classe de compostos fenólicos em plantas.....	26
Tabela 05 – Teor de β -caroteno no epicarpo, mesocarpo e óleo bruto do tucumã.....	28
Tabela 06 – Principais sub-classes dos flavonóides, cor, flavonóides representativos e fontes alimentares.....	30
Tabela 07 – Grupos experimentais e protocolos de tratamento agudo para o teste do micronúcleo.....	39
Tabela 08 – Frequências de PCEMNs em sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> tratados com AA (grupos genotóxicos) após 24h em diferentes concentrações e seus respectivos controles.....	
Tabela 09 – Frequências de PCEMNs em sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> tratados com AA + DXR (grupos antigenotóxicos) após 24h em diferentes concentrações e seus respectivos controles.....	46

Tabela 10 –	Frequências de PCEMNs em sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> submetidos ao tratamento por gavagem de AA (grupos genotóxicos) após 48h em diferentes concentrações e seus respectivos controles.....	47
Tabela 11 –	Frequências de PCEMNs em sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> submetidos AA + DXR (grupos antigenotóxicos) após 48h em diferentes concentrações e seus respectivos controles.....	48
Tabela 12 –	Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) do sangue periférico de animais submetidos a tratamento de diferentes doses de AA e seus respectivos controles.....	49
Tabela 13 –	Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs / 1000 PCEs) e IDN em sangue periférico de camundongos suíços tratados com <i>Astrocaryum aculeatum</i> óleo fixo e DXR e seus respectivos controles 24 e 48 h pós-tratamento.....	51

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	18
1.1. PLANTAS MEDICINAIS	19
1.2. <i>ASTROCARYUM aculeatum</i>	20
1.3. ANTIOXIDANTES	24
1.4. METABÓLITOS SECUNDÁRIOS	25
1.4.1. Carotenóides	27
1.4.2. Flavonóides	29
1.5. TESTE DO MICRONÚCLEO	31
2. OBJETIVOS	34
2.1. OBJETIVO GERAL	35
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
3. MATERIAL E MÉTODOS	36
3.1. OBTENÇÃO DO ÓLEO DA <i>Astrocaryum aculeatum</i>	37
3.2. AGENTES QUÍMICOS INDUTORES DE DANOS NO DNA	38
3.3. ANIMAIS E TRATAMENTOS	38
3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL	38
3.5. TESTE DE MICRONÚCLEOS	40

3.6.	ANÁLISE DAS LÂMINAS	40
3.7.	ANÁLISE ESTATÍSTICA	41
4.	RESULTADOS	43
5.	DISCUSSÃO	53
6.	CONCLUSÃO	64
7.	REFERÊNCIAS	66
ANEXO A	84

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 PLANTAS MEDICINAIS

Desde tempos imemoráveis, as plantas são utilizadas como instrumentos medicinais, e a história da humanidade, vem usufruindo de suas propriedades até os dias de hoje. O homem, em sua capacidade de compreender, analisar e modificar o meio em que vive, na busca pela sobrevivência, explorou e continua explorando as plantas, extraindo delas compostos biológicos para proveito próprio.

As observações populares sobre o uso e a eficácia de plantas medicinais contribuem de forma relevante para a divulgação das virtudes terapêuticas dos vegetais, prescritos com frequência, pelos efeitos medicinais que produzem, apesar de não terem seus constituintes químicos conhecidos.

Os compostos químicos presentes nas plantas, são mediadores de efeitos específicos para cada composto, assim como os efeitos já bem compreendidos das drogas convencionais. Sendo assim, terapias a base de plantas (Fitoterapia), podem ser tão eficazes quanto a feita com fármacos convencionais (MACIEL, M. A. et al., 2002).

A fitoterapia tem a capacidade de olhar além dos sintomas habilmente observado pelo médico treinado, pode oferecer soluções reais e permanentes para problemas aparentemente intratáveis por intervenção farmacêutica (GOGTAY, 2002).

Os curandeiros tradicionais têm usado por muito tempo plantas para prevenir ou curar doenças infecciosas. As plantas medicinais constituem agora o segmento de mais rápido crescimento do mercado total farmacêutica norte-americano (MAHOMOODALLY, 2010).

O uso de drogas e suplementos alimentares derivados de plantas alimentares têm acelerado nos últimos anos. Farmacologistas, botânicos, microbiologistas, vasculham o planeta atrás de produtos fitoquímicos que poderiam ser desenvolvidos para o tratamento de doenças infecciosas (BALANDRIN, 1985).

Além disso, o desenvolvimento da química moderna permitiu o isolamento de produtos químicos a partir de ervas medicinais, que serviram como drogas ou materiais de partida para a síntese de muitos medicamentos importantes utilizados hoje. As drogas tais como a aspirina, digitalis, morfina, quinina foram todas originalmente isoladas ou sintetizadas a partir de materiais derivados de plantas (MATHEWS, 1999).

Dessa forma, usuários de plantas medicinais de todo o mundo, mantêm em voga a prática do consumo de fitoterápicos, tornando válidas informações terapêuticas que foram sendo acumuladas durante séculos. De maneira indireta, este tipo de cultura medicinal desperta o interesse de pesquisadores em estudos envolvendo áreas multidisciplinares, enriquecem os conhecimentos sobre a inesgotável fonte medicinal natural: a flora mundial (MACIEL, et al., 2002).

Mesmo que o ser humano tenha explorado as plantas por tanto tempo, e continua a explorar, é irrisório o conhecimento adquirido se for levado em consideração tudo que ainda há por se conhecer e desvendar sobre plantas medicinais.

1.2 *Astrocaryum aculeatum* (TUCUMÃ)

O Tucumã é um fruto oriundo de uma palmeira da família das Arecaceae que chega a medir em torno de 10 a 25 metros de altura e 15 a 30cm de diâmetro, geralmente solitária, apresenta um caule com faixas, espinhos escuros, folhas ascendentes, flores dispostas de forma ereta com frutos de cor amarela e tons avermelhados, e de ampla distribuição na Amazônia, que por sua vez, apresenta grande biodiversidade do gênero *Astrocaryum* (Figura 01), (BACELAR-LIMA; COLETTI; GRIBEL, 2003; BACELAR-LIMA.; MENDONÇA; BARBOSA, 2006; MILLÁN e KAHN, 2010).



Figura 01: Palmeira da família das Arecaceae.
Fonte: ARARA, 2015.

No Brasil, o tucumã se dá nos estados do Acre, Amapá, Amazonas, Pará e Rondônia. É uma espécie excepcionalmente tolerante a solos ácidos e pobres em nutrientes, característica marcante do solo da região amazônica (FERREIRA e GENTIL, 2006).

A polpa é bastante apreciada e consumida pela população nativa na forma *in natura*. O fruto tem formato ovóide, coloração amarelo avermelhada, cujo mesocarpo é fibroso (Figura 02). Os aspectos morfológicos do fruto estão apresentados na Tabela 01. Seu teor nutricional é rico em calorias (Tabela 02), devido ao elevado conteúdo de lipídios (Tabela 03), o que permite apresentar grande teor pró-vitamina A. Portanto, o tucumã pode contribuir como fonte energética, na prevenção de carências nutricionais como a desnutrição energético protéica, que também constitui um problema de saúde pública no Brasil, bem como no combate a hipovitaminose A, especialmente nas regiões Norte e Nordeste do país (KAHN e MOUSSA, 1997; YUYAMA et al., 2008; VASCONCELOS, 2010).



Figura 02: *Astrocarium aculeatum*
Fonte: ARARA, 2015.

Tabela 01: Valores morfométricos de estudos realizados com o Tucumã.

Variáveis avaliadas	Média	(¹) e (²)
Massa do fruto (g)	47,5	25,9 – 76,4
Comprimento (mm)	50,6	41,5 – 61,7
Largura (mm)	41,8	34,3 – 51,1
Massa do epicarpo (g)	8,6	5,40 – 12,5
Massa do mesocarpo (g)	10,3	5,70 – 20,6
Massa do endocarpo (g)	11,3	4,70 – 20,3
Espessura mesocarpo (mm)	3,9	2,50 – 5,20
Espessura endocarpo (mm)	3,5	2,10 – 4,10
Mesocarpo (%)	21,9	15,0 – 33,0
Endocarpo (%)	22,4	15,2 – 29,7

(¹)= valores médios; (²) = valores mínimos e máximos.

Fonte: KAHN e MOUSSA, 1997.

Tabela 02: Composição bioquímica do Tucumã em 100g.

Componentes	Média (%)
Umidade (%)	44,90 ± 0,30
pH	5,47 ± 0,01
Proteínas (%)	3,54 ± 0,07
Lipídeos (ácidos graxos) (%)	40,49 ± 0,54
Fibras (%)	10,93 ± 0,10
Carboidratos totais (%)	8,54 ± 0,61
Energia (Kcal/100g)	412,73 ± 2,12

Fonte: VASCONCELOS, 2010

Tabela 03: Principais compostos de ácidos graxos no óleo de tucumã.

Ácidos graxos (Estrutura)	Ácidos graxos (Nomes)	Média (%)
C18:1	Oleico	72,65
C18:2	Linoléico	11,60
C16:0	Palmítico	8,30
C18:0	Esteárico	6,06
C20:0	Eicosanóico	1,40
-	Outros	-

Fonte: VASCONCELOS, 2010

O consumo de tucumã deve ser incentivado, uma vez que a busca por antioxidantes naturais tem aumentado muito nos últimos anos, principalmente para aplicações nos setores farmacêuticos, cosméticos e nutricionais (FERREIRA, 2008).

Encontra-se também presente no tucumã polifenóis (flavonóides) importantes, como a quercetina e a rutina, sendo a quercetina o principal flavonóide presente na dieta humana. Os flavonóides são compostos que ocorrem em plantas, que apresentam propriedades antioxidantes. O consumo de frutos ricos em antioxidantes evita a oxidação excessiva produzida pelo próprio organismo, no qual ocorre produção de radicais livres que, se não controlados, podem provocar danos

celulares como o desenvolvimento de várias doenças crônicas e degenerativas (GONÇALVES, 2008).

Os antioxidantes bloqueiam os efeitos danosos causados pelos radicais livres, que são grandes responsáveis de processos do envelhecimento celular acelerado, bem como de doenças carcinogênicas (BECHO et al., 2010).

1.3 ANTIOXIDANTES

Uma ampla definição de antioxidante é “qualquer substância que, presente em baixas concentrações quando comparada a do substrato oxidável, atrasa ou inibe a oxidação deste substrato de maneira eficaz” (SIES e STAHL, 1995). Esses agentes que protegem as células contra os efeitos dos radicais livres podem ser classificados em sistemas enzimáticos ou não-enzimáticos. O sistema enzimático evita o acúmulo de ânion radical superóxido (O_2^-) e do peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Esse sistema compreende diversas enzimas, dentre as quais se destacam: superóxido-dismutase; catalase; e a glutathione peroxidase (STAHL e SIES, 2003).

A superóxido-dismutase corresponde a uma família de enzimas com diferentes grupos prostéticos em sua composição estando presente principalmente no citosol, e na mitocôndria, apresentando papel antioxidante pois catalisa a dismutação do radical superóxido em H_2O_2 e O_2 , na presença do próton H^+ . A catalase é uma hemoproteína citoplasmática que catalisa a redução do H_2O_2 a H_2O e O_2 . E por fim, a glutathione peroxidase catalisa a redução do H_2O_2 e peróxidos orgânicos para seus correspondentes álcoois (STAHL e SIES, 2003).

Já o sistema não-enzimático, podendo ser dividido em dois grupos: hidrofílicos (glutathione, vitamina C, indóis e catecóis); e lipofílicos (Flavonóis, Vitamina A e Vitamina E), sendo que o primeiro grupo exerce seu papel oxidante fundamentalmente através do plasma sanguíneo devido sua propriedade de hidrossolubilidade, enquanto o segundo grupo atua essencialmente nas membranas celulares por sua propriedade lipossolúvel. Os Antioxidantes não-enzimáticos são obtidos através da dieta, e podem auxiliarem favoravelmente os mecanismos endógenos de defesa tais como: superóxido-dismutase, catalase e glutathione peroxidase (BRENNAN e PAGLIARINI, 2001; YILDRIM, MAVI e KARA, 2003).

Diversos estudos têm demonstrado que o consumo de substâncias antioxidantes na dieta diária, pode produzir uma ação protetora efetiva contra os processos oxidativos que naturalmente ocorrem no organismo, estabelecendo uma relação preventiva de doenças degenerativas, câncer, aterosclerose, diabetes, além destas substâncias influenciarem positivamente nos processos responsáveis pelo envelhecimento do corpo, retardando-os (BRENNA e PAGLIARINI, 2001; YILDRIM, MAVI e KARA, 2003).

Há também os conhecidos antioxidantes sintéticos, que são compostos produzidos em laboratórios que possuem ação contra agentes oxidativos. Contudo, o interesse em encontrar antioxidantes naturais para o emprego em produtos alimentícios ou para uso farmacêutico, tem aumentado consideravelmente, com o intuito de substituir antioxidantes sintéticos, os quais tem sido restringido devido ao seu potencial de carcinogênese, bem como pela comprovação de diversos outros males como: aumento do peso do fígado e significativa proliferação do retículo endoplasmático (SIMÃO, 1985; ZHENG & WANG, 2001; MELO e GUERRA, 2002; YILDRIM, MAVI e KARA, 2003).

As matérias-primas *in natura* disponíveis como: frutas, vegetais em geral e condimentos contém numerosos fitoquímicos além dos compostos fenólicos como por exemplo compostos nitrogenados, carotenoides e bioflavonóis. Muitos destes fitoquímicos apresentam significativa capacidade antioxidante e são associados à baixa incidência e baixa mortalidade de câncer em seres humanos (WATANABE, 1998; BIRCH et al., 2001; TOMÁS-BARBERÁN et al., 2001; VAN DER SLUIS et al., 2001; VINSON et al., 2001; WANG & ZHENG, 2001; ZHENG e WANG, 2001; YILDRIM, MAVI e KARA, 2003).

1.4 METABÓLITOS SECUNDÁRIOS

Os vegetais são fontes de compostos orgânicos que não estão diretamente envolvidos nos processos de crescimento, desenvolvimento e reprodução do organismo vegetal, estes compostos são denominados de metabólitos secundários, e são largamente encontrados nas plantas em geral.

Segundo Taiz & Zeiger (2004), os metabólitos secundários não exercem ação direta conhecida em importantes processos fisiológicos, como: fotossíntese; respiração; transporte de solutos; síntese de carboidratos, proteínas e lipídeos; assimilação de nutrientes; e diferenciação dos tecidos.

Em contrapartida, ao fato de não serem reconhecidos como essenciais para o organismo produtor, Santos (2004), destaca funções ecológicas importantes tais como: proteção contra predadores; retenção de água; controle da temperatura; atração de polinizadores; além de atuarem com inibidores da germinação o que pode garantir vantagens para a sobrevivência e perpetuação da espécie.

Dentre os metabólitos secundários estão os compostos fenólicos, que por sua vez são encontrados em abundância nos mais variados grupos do reino vegetal. Os compostos fenólicos podem ser em várias classes como descrito na Tabela 04, onde dentro das diferentes classes mais de 8.000 diferentes compostos já foram descritos (BRAVO, 1998).

Tabela 04: Classe de compostos fenólicos em plantas.

Classe	Estrutura
Fenólicos simples, benzoquinonas	C_6
Ácidos hidroxibenzóicos	C_6-C_1
Ácidos fenilacéticos, acetofenol	C_6-C_2
Ácidos hidroxicinâmicos, fenilpropanóides	C_6-C_3
Nafitoquinonas	C_6-C_4
Xantonas	$C_6-C_1-C_6$
Antoquinonas, estilbenos	$C_6-C_2-C_6$
Flavonóides, isoflavonóides	$C_6-C_3-C_6$
Lignanas, neolignanas	$(C_6-C_3)_2$
Biflavonóides	$(C_6-C_3-C_6)_2$
Ligninas	$(C_6-C_3)_n$
Taninos condensados	$(C_6-C_3-C_6)_n$

Fonte: ANGELO e JORGE, 2007.

A diversidade estrutural desses compostos deve-se a grande variedade de combinações possíveis e encontradas na natureza de modo que a resultante desses compostos denomina-se polifenóis, que por sua vez, pode ser dividido em: ácidos fenólicos; flavonóides e taninos (HARBORNE, 1989; BAXTER e HARBORNE, 1998; KING e YOUNG, 1999; CIMPOIU, 2006).

1.4.1 Carotenóides

Existem muitos compostos químicos naturais que exercem suas propriedades funcionais de benefícios à saúde, por meio da proteção contra agentes cancerígenos; esses compostos seriam, portanto, fitoquímicos que possuem propriedades quimiopreventivas são encontradas nos alimentos (GOMES, 2007).

Os alimentos oferecem diversas possibilidades de proteção ao organismo contra o desenvolvimento do câncer e outras doenças crônicas; entre os vários fatores que têm sido considerados responsáveis por essa proteção, podem ser citados os carotenoides (WILLCOX, ASH e CATIGNANI, 2004).

Os carotenóides são uma classe de pigmentos naturais amplamente distribuídos em legumes e frutas, sendo responsável pela cor amarelo-avermelhada de muitos alimentos. Além de suas propriedades corantes, os carotenóides apresentam importantes funções e ações fisiológicas sendo provitamina A a mais conhecida (FERREIRA, 2008).

Os carotenóides são imprescindíveis para a diferenciação celular, o desenvolvimento embrionário, e a visão, bem como tendo muitas outras funções, incluindo potenciais benefícios terapêuticos no tratamento de várias morbidades devido às suas propriedades antioxidantes (GOMES, 2007).

Existem, aproximadamente, 600 carotenóides encontrados na natureza, os quais são constituídos por dois grandes grupos, denominados: carotenos, que consistem em hidrocarbonetos puros; e xantofilas, hidrocarbonetos que possuem grupos funcionais oxigenados. Desses, cerca de 60 podem ser encontrados nos alimentos e, como resultado de uma absorção seletiva do trato gastrointestinal, apenas 14 carotenóides são biodisponíveis, biodisponibilidade que se apresenta de

forma quase ilimitada (KHACHIK et al., 1991; PARKER, et al.,1999; HAEGELE, et al., 2000).

Entre esses se encontram o β -caroteno, muito promissor no que se refere à proteção contra o câncer, mas ainda pouco estudado e, portanto, escassamente descrito (GOMES 2007).

O β -caroteno é dentre os carotenoides, reconhecidamente o mais potente antioxidante, promovida pelo retinol (vitamina A) (Tabela 05), do qual é precursor, onde uma alimentação com suplementação de alimentos ricos em β -caroteno, estão associados a resultados significativos em relação a redução de risco de câncer. Portanto, se faz necessário conhecer o efetivo papel do β -caroteno como composto quimiopreventivo (BECHO et al, 2010).

Tabela 05: Teor de β -caroteno no epicarpo, mesocarpo e óleo bruto do tucumã.

	β -caroteno ($\mu\text{g}/100\text{g}$)	Vitamina A (RAE/100g)
Epicarpo	14.769,28 \pm 760,93	1.230,77 \pm 63,41
Mesocarpo	11.616,58 \pm 580,82	968,05 \pm 48,40
Óleo bruto	21.842,74 \pm 932,02	1.820,23 \pm 77,67

RAE = Retinol Activity Equivalent, onde 1 RAE = 1 μg de retinol = 12 μg β -caroteno.

Fonte: FERREIRA, 2008.

Inicialmente foi atribuída ao β -caroteno uma atividade pró-oxidante, ou seja, de promoção da oxidação, ao invés de proteção contra essa oxidação, quando esse atuava em tecidos sob tensões de oxigênio muito elevadas, entretanto, investigações posteriores, mais detalhadas, observaram que ocorre apenas um decréscimo da ação antioxidante, pelo processo de auto-oxidação do β -caroteno (KRINSKY, 2001).

Sob condições fisiológicas de $p\text{O}_2$ e adequadas concentrações plasmáticas (1 a 4-5 μm), o β -caroteno é capaz de prevenir danos celulares; diminuir os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) no meio intra-celular, reduzindo os riscos de lesão de material genético; e promover ação antioxidante nas células (KRINSKY, 2001; GOMES, 2007).

1.4.2 Flavonóides

Os compostos fenólicos são as principais classes de metabólitos secundários. Estes compostos são largamente encontrados nas plantas. Sendo estes derivados do ácido chiquímico e fenilpropanoídica. Suas estruturas se caracterizam por apresentarem um anel aromático associados a um ou mais grupos hidroxilas. Dentre os compostos Fenólicos que se relacionam com a dieta humana destacam-se três grandes grupos: Flavonóides; Ácidos fenólicos e os Taninos (SHAHIDI, et al., 1997; NACZK e SHAHIDI, 2004; YAO et al., 2004).

A estrutura dos flavonóides é caracterizada como difenilpropanos ($C_6-C_3-C_6$), apresentando 15 átomos de carbonos arranjados em três anéis, identificados como A, B e C, de maneira a permitir que sua estrutura química em seus diferentes arranjos, sejam classificados em flavonoide, flavanol, antocianidina, flavona e flavonol (Figura 03 e Tabela 06) (ANGELO e JORGE, 2007).

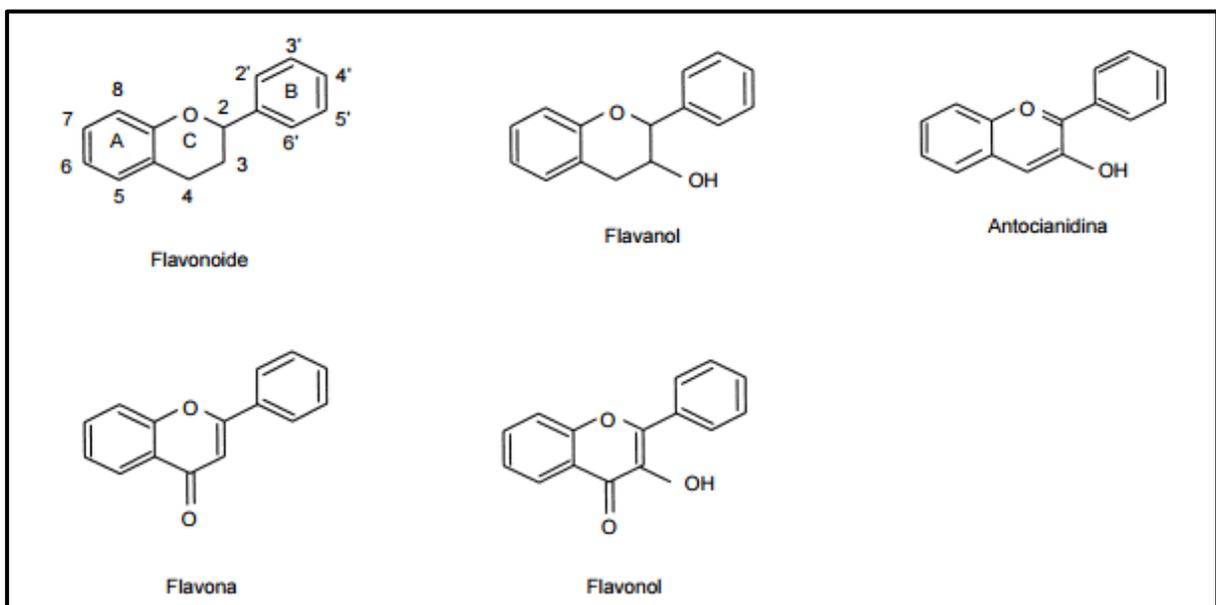


Figura 03 – Flavonóides – Estrutura básica e tipos.
Fonte: COUTINHO, 2009.

O potencial antioxidante dos Flavonóides é uma dentre várias atividades biológicas que têm sido associadas positivamente com a prevenção de

enfermidades cardiovasculares e carcinogênicas em estudos realizados principalmente em países emergentes e desenvolvidos (MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000). Contudo, apesar de estabelecido a relação positivo dos flavonoides em doenças carcinogênicas os mecanismos pelo qual os flavonoides agem, enquanto agente anticarcinogênico, ainda não foram elucidados.

Tabela 06: Principais sub-classes dos flavonóides, cor, flavonóides representativos e fontes alimentares.

Sub-classes	Cor	Principais Representantes	Fontes Alimentares
Antocianidina	Azul, vermelho e violeta	Cianidina	Frutas e Flores
Flavanol	Incolor e amarelo	Catequinas	Maçã, Cerveja, Uva
Flavanona	Incolor e amarelo	Hesperidina e Naringenina	Frutas Cítricas
Flavona	Amarelo claro	Apigenina e Luteolina	Cereais
Flavonol	Amarelo claro	Quercetina e Rutina	Cebola, Maçã, Tucumã

Fonte: VAN ACKER, 1996.

De acordo com Pannala et al., 2001 e Ribeiro e Seravalli, 2004, a eficácia de antioxidantes fenólicos se relaciona com a estabilidade de seus radicais intermediários frente a ação de radicais livres, desta forma, a quercetina e a rutina se destacam como potente antioxidante.

Portanto, os flavonóides, por apresentarem uma grande diversidade de atividades biológicas benéficas para o ser humano têm sido extensamente pesquisados. Dentre eles se destaca a rutina e a quercetina, ambas com extensa

distribuição no reino vegetal que por apresentar entre outras atividades biológicas a anticarcinogênica tem sido objeto de muito estudo em diversas áreas, podendo contribuir para o futuro tratamento de várias enfermidades entre elas o câncer (BECHO et al, 2010).

1.5 TESTE DO MICRONÚCLEO

Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos e de cromossomos inteiros que não estão incorporados ao núcleo da célula filha durante a divisão celular. Trata-se de pequenos corpos de DNA sem conexão estrutural com o núcleo principal (AGOSTINI, 1993).

Todavia, o surgimento de micronúcleos é indicativo de um erro no processo de divisão celular, logo a presença de micronúcleos pode ser considerada um marcador de alterações cromossômicas, onde a análise de sua frequência oferece base aos métodos citogenéticos de análise cromossomal.

Segundo Yamamoto e Kikuchi (1981), o critério para se identificar, a origem de um micronúcleo, seria a observação do tamanho do mesmo, que pode variar de acordo com o agente indutor, sendo assim, os originados de fragmento de cromossomos, devem ser menores do que os originados de cromossomos inteiros.

A frequência de micronúcleos deve ser calculada com base em células que se dividiram pelo menos uma vez; logo, podem ocorrer em qualquer tipo de célula, em diferentes organismos, desde que a célula sofra divisão.

O Teste do Micronúcleo permite identificar eventual aumento na frequência de mutação em células expostas a agentes genotóxicos, através do número de Micronúcleos gerados em decorrência de tal exposição.

Assim o Teste do Micronúcleo, entre os demais testes citogenéticos, e o que fornece uma medida confiável acerca da perda do cromossomo e de sua ruptura (FENECH,1998).

Em animais, principalmente mamíferos, tais como ratos e camundongos, frequentemente são utilizadas células da medula óssea, podendo ser usado também

células do sangue circulante. Na espécie humana, a análise é comum em linfócitos de sangue periférico.

A célula ao entrar em processo de divisão, e dar origem a um micronúcleo no momento da telófase (Figura 04), por fragmentos acêntricos, produzidos por quebras cromossômicas ou cromatídicas, ou os cromossomos inteiros, perdidos por problemas no fuso mitótico, e incluídos na célula filha, que ao se difundir com o núcleo principal, formam um ou mais núcleos secundários – os micronúcleos (AGOSTINI, 1993).

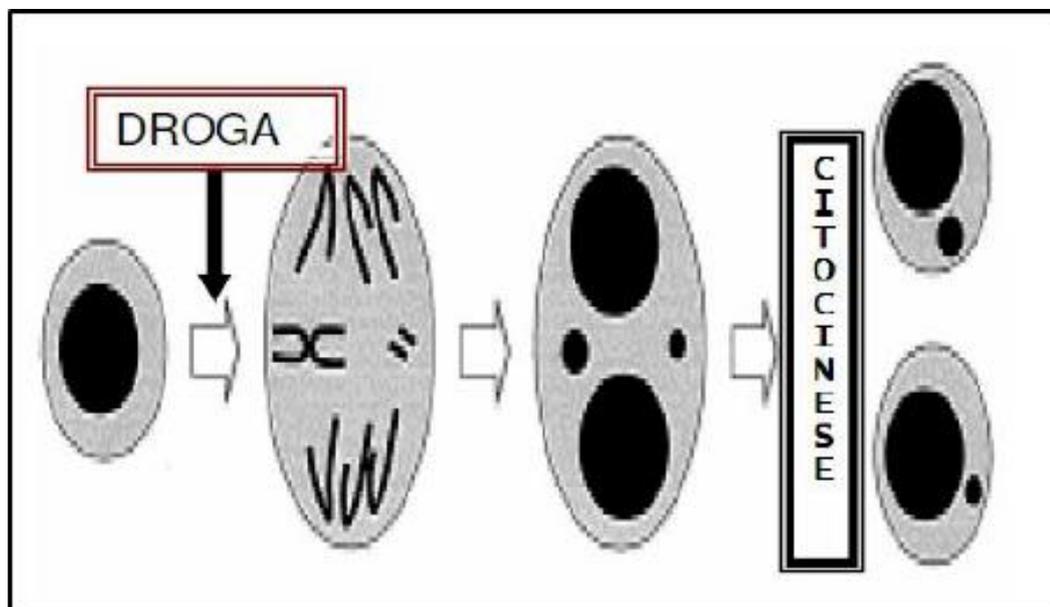


Figura 04: Diagrama ilustrando a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro.

Fonte: DA SILVA, 2011.

As análises citogenéticas feitas com micronúcleo são capazes de identificar repercussões citogenéticas em indivíduos expostos a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos.

O teste do micronúcleo constitui um dos métodos mais eficazes para medida de danos de cromossomos, sejam eles espontâneos ou induzidos, ou ainda de segregação, uma vez que o micronúcleo resulta da produção de fragmentos acêntricos ou de cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula na anáfase (RIBEIRO, 2003).

Esse teste é bastante utilizado para avaliação de instabilidade cromossômica e sensibilidade a mutagênicos e/ou clastogênicos. O método pode ser aplicado tanto *in vitro* quanto *in vivo* de forma rápida, gerando dados precisos, servindo assim, de teste primário em genética toxicológica (RIBEIRO, 2003).

OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Obtenção do Óleo Fixo da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) e sua avaliação genotóxica e/ou antigenotóxica *in vivo* a partir do tratamento agudo em camundongo *swiss*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obtenção do Óleo Fixo da *Astrocaryum aculeatum*;
- Avaliação genotóxica por tratamento agudo pelo teste do micronúcleo em camundongos *swiss*;
- Avaliação antigenotóxica por tratamento agudo pelo teste do micronúcleo em camundongos *swiss*;
- Identificação da citotoxicidade pelo método de IDN (Índice de Divisão Nuclear).

MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO ÓLEO DA *Astrocaryum aculeatum*

O fruto foi lavado a seco descascado e teve o caroço retirado; de modo a destacar o mesocarpo do restante do fruto e distribuí-lo em bandejas para desidratação em estufa com recirculação de ar a 50°C durante 24 horas, resfriada a temperatura ambiente. A massa resultante foi quantificada 28,21%. O material seco foi submetido à prensagem hidráulica, com capacidade de 15 toneladas (SIWA modelo FM3), rendendo 22,21% de óleo fixo (Figura 05).

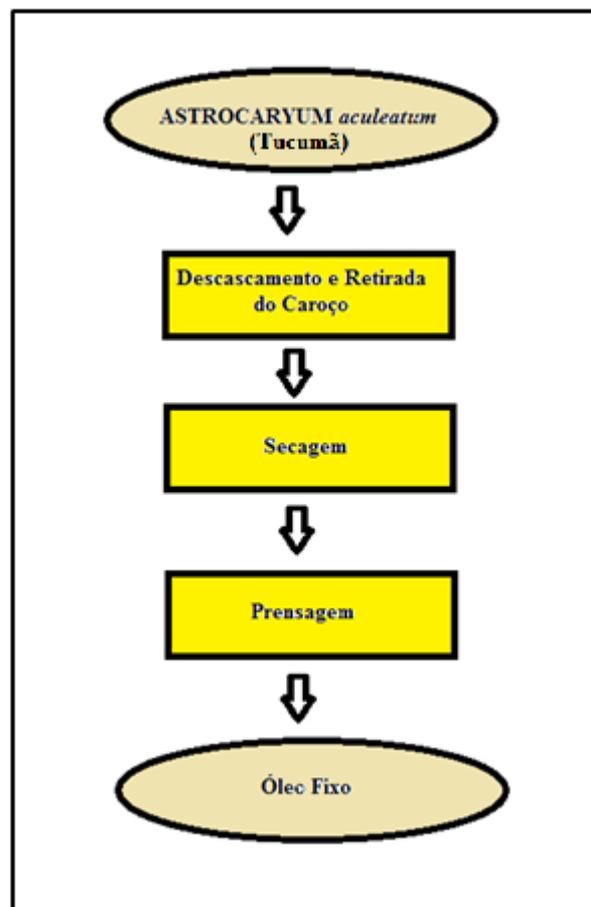


Figura 05: Fluxograma do processo de obtenção do óleo fixo do tucumã, por prensagem hidráulica.

3.2 AGENTES QUÍMICOS INDUTORES DE DANOS NO DNA

O quimioterápico doxorrubicina (DXR, Rubidox®, São Paulo – SP) foi utilizado como indutor de micronúcleos em células de sangue periférico. Os indutores foram dissolvidos em água destilada e administrados intraperitonealmente (0,3 mL/animal). A concentração de DXR (15 mg/Kg peso corpóreo, p.c.) foi estabelecida de acordo com a literatura (FRANKE et al., 2005; VENKATESH et al., 2007).

3.3 ANIMAIS E TRATAMENTOS

Para realização dos experimentos, foram utilizados camundongos machos *swiss* com 6-7 semanas de vida e aproximadamente 30 g de peso corpóreo (p.c.), provenientes do Biotério do **Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)**.

A pesquisa foi conduzida de acordo com os protocolos aceitos internacionalmente para o uso e cuidado de animais de laboratório. Os animais foram mantidos em caixas com grades com dimensões de 30x19x12cm em uma sala experimental sob condições controladas de temperatura ($22\pm 2^{\circ}$ C), umidade ($50\pm 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* à ração e água.

Os protocolos de tratamentos realizados neste trabalho foram submetidos ao Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAP, sob o protocolo 0012/2015 (Anexo 1).

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em diferentes grupos, contendo seis camundongos em cada grupo de tratamento (Tabela 07). As concentrações utilizadas do óleo fixo da *Astrocaryum aculeatum* (AA) de 500, 1.000 e 2.000 mg/kg

p.c., administradas por gavagem (0,5 mL) para observação dos processos genotóxicos.

Para a avaliação antigenotóxica, imediatamente após a administração da A.A., os animais foram tratados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de DXR (0,3 mL/25 g p.c.).

O grupo solvente foi tratado por gavagem (0,5 mL/30 g p.c.) com a mesma dose de dimetilsulfóxido (DMSO) que os animais que receberão 2.000 A.A/kg p.c. As amostras do sangue periférico dos grupos de tratamento agudo foram coletadas após 24h e 48 h, de administração do óleo da A.A., para a realização da leitura do teste do micronúcleo.

As concentrações utilizadas seguiram os protocolos internacionais, Guidelines, onde os mesmos indicam que, não havendo trabalhos realizados com o produto, no qual descreve sua atividade biológica, a mesma deve-se partir do princípio de 2000 mg reduzindo-se a metade.

Tabela 07: Grupos experimentais e protocolos de tratamento agudo para o teste do micronúcleo.

Tratamento	Grupo ^a	Dose (mg/kg p.c.)
Controle Negativo	1	-
DMSO	2	-
AA I	3	500
AA II	4	1.000
AA III	5	2.000
DXR	6	15
DMSO + DXR	7	Como em (2) e (6)
AA I + DXR	8	Como em (3) e (6)
AA II + DXR	9	Como em (4) e (6)
AA III + DXR	10	Como em (5) e (6)

DMSO, Dimetilsulfóxido; A.A., *Astrocaryum aculeatum*; DXR, Doxorubicina.

^a Cada grupo de tratamento terá seis animais.

3.5 TESTE DE MICRONÚCLEOS

Para obtenção de PCEMNs em sangue periférico foi baseada na técnica de MacGregor et al (2000), e adaptada, consistindo nos seguintes procedimentos:

- A. Cortou-se a ponta da cauda dos animais e gotejou-se o sangue diretamente sobre as lâminas secas;
- B. Fez-se o esfregaço do material com uma lamínula;
- C. Após a secagem do material, este foi fixado em metanol por 5 minutos;
- D. No dia seguinte, corou-se com Giemsa de acordo com o Manual de Diagnóstico Laboratorial da Malária, Ministério da Saúde 2005. Sendo utilizado Giemsa em pó 0,75g; para cada 100 ml de solução de Glicerol 35 ml e Metanol 65 ml utilizando uma proporção de 1:10 (Giemsa/água tamponada) por 20 minutos.
- E. Analisou-se ao microscópio óptico os micronúcleos em PCEs que se coraram de azul e que são mais jovens. Os Eritrocitos Normocromáticos (NCEs) mais maduros, sofreram pouca ou nenhuma influência do corante, não foram analisados.

3.6 ANÁLISE DAS LÂMINAS

As lâminas de todos os animais (grupos tratados, controle negativo e controle positivo) foram codificadas e analisadas dentro de um curto espaço de tempo, de modo a eliminar erros de análise.

A análise foi feita por três observadores, seguindo um sistema balanceado, ou seja, números iguais de células foram analisadas em lâminas diferentes, em cada animal do estudo, por cada observador.

As lâminas foram, em primeiro lugar, analisadas ao microscópio óptico em aumento médio de 40x para encontrar campos com boa qualidade técnica, onde as células encontravam-se bem espalhadas, não danificadas e coradas apropriadamente.

Após localizar esse campo, os observadores seguiram a análise das células para a presença do micronúcleo, usando um aumento de 100x (objetiva de imersão).

O principal resultado do teste é a frequência de Eritrócitos Policromáticos (PCE) que contém pelo menos um micronúcleo (frequência de PCEMNs), de modo que para sua determinação foram analisados 2000 PCEs por animal nas amostras de sangue periférico (24h e 48h) e um total de 400 eritrócitos por animal foram analisados para calcular o índice de Divisão Nuclear (IDN), utilizando a fórmula:

$$\text{IDN} = \frac{\text{PCE}}{\text{PCE} + \text{NCE}}$$

A porcentagem de redução de frequência de PCEMNs, para determinação da efetividade dos tratamentos para efeito antigenotóxico, foi calculada de acordo com Warters et al (1990). Usando a seguinte fórmula:

$$\% \text{ de Redução} = \frac{\text{Frequência de PCEMNs em A} - \text{Frequência de PCEMNs em B}}{\text{Frequência de PCEMNs em A} - \text{Frequência de PCEMNs em C}}$$

Onde A corresponde ao grupo DXR (controle positivo), B, corresponde aos grupos tratados com AA + DXR (grupos antigenotóxicos) e C, corresponde ao grupo tratado com água (controle negativo).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente por análise de variância (ANOVA) para experimentos inteiramente aleatórios, com o cálculo da estatística F e de seus respectivos “*p*-value”. Nos casos em que $P < 0,05$, as médias de tratamento

foram comparadas pelo método de Tukey, com o cálculo da diferença mínima significativa para $\alpha = 0,05$, foi utilizado o programa Graph Pad Prism 6.

RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os resultados obtidos das análises das frequências de PCEMNs de sangue periférico de animais (Figura 05) submetidos aos tratamentos agudos de 24h e 48h com AA em diferentes concentrações estão apresentados na e Tabelas 08, 09, 10 e 11. Os dados mostraram que houve pequena variabilidade no número de PCEMNs entre animais do mesmo grupo, porém essa variação não se mostrou estatisticamente significativa ($P>0,05$), nos dois tempos de amostragem utilizados.

Quando o total da frequência de PCEMNs de 24h e 48h é obtida por grupos, nota-se que os grupos que receberam exclusivamente diferentes doses de AA apresentaram frequência de PCEMNs maiores quando comparados com o controle negativo, demonstrando assim, ausência de efeito genotóxico. Portanto, não houve diferença estatística relevante ($P>0,05$) (Tabela 12).

Todavia, os resultados somados em cada grupo para os grupos que receberam AA em diferentes concentrações associadas a DXR, e avaliadas 24h e 48h após o tratamento, quando comparado com o controle positivo (DXR), demonstraram notável diminuição na frequência de PCEMNs, denotando assim a presença de efeito antígenotóxico. Logo, a análise estatística evidenciou diferença significativamente relevante para estes valores ($P<0,05$) (Tabela 12).



Figura 06: Eritrócito policromático micronucleado

Tabela 08: Frequências de PCEMNs em sangue periférico de camundongos *Swiss* tratados com AA (grupos genotóxicos) após 24h em diferentes concentrações e seus respectivos controles.

Tratamento	Animal	Nº de PCEs Analisados	Nº de PCEMNs
Controle Negativo	M1	2000	5
	M2	2000	4
	M3	2000	5
	M4	2000	4
	M5	2000	4
	M6	2000	5
DMSO	M1	2000	5
	M2	2000	5
	M3	2000	6
	M4	2000	6
	M5	2000	5
	M6	2000	6
AA I	M1	2000	4
	M2	2000	4
	M3	2000	4
	M4	2000	6
	M5	2000	5
	M6	2000	6
AA II	M1	2000	5
	M2	2000	5
	M3	2000	5
	M4	2000	6
	M5	2000	4
	M6	2000	4
AA III	M1	2000	4
	M2	2000	5
	M3	2000	5
	M4	2000	4
	M5	2000	5
	M6	2000	5
DXR	M1	2000	28
	M2	2000	29
	M3	2000	31
	M4	2000	28
	M5	2000	27
	M6	2000	28

M, macho.

Tabela 09: Frequências de PCEMNs em sangue periférico de camundongos *Swiss* tratados com AA + DXR (grupos antigenotóxicos) após 24h em diferentes concentrações e seus respectivos controles.

Tratamento	Animal	Nº de PCEs Analisados	Nº de PCEMNs
Controle Negativo	M1	2000	5
	M2	2000	4
	M3	2000	5
	M4	2000	4
	M5	2000	4
	M6	2000	5
DXR	M1	2000	28
	M2	2000	29
	M3	2000	31
	M4	2000	28
	M5	2000	27
	M6	2000	28
DMSO + DXR	M1	2000	29
	M2	2000	29
	M3	2000	27
	M4	2000	28
	M5	2000	28
	M6	2000	28
AA I + DXR	M1	2000	22
	M2	2000	19
	M3	2000	20
	M4	2000	21
	M5	2000	19
	M6	2000	20
AA II + DXR	M1	2000	21
	M2	2000	20
	M3	2000	20
	M4	2000	18
	M5	2000	19
	M6	2000	20
AA III + DXR	M1	2000	19
	M2	2000	20
	M3	2000	20
	M4	2000	19
	M5	2000	17
	M6	2000	21

M, macho.

Tabela 10: Frequências de PCEMNs em sangue periférico de camundongos *Swiss* submetidos ao tratamento por gavagem de AA (grupos genotóxicos) após 48h em diferentes concentrações e seus respectivos controles.

Tratamento	Animal	Nº de PCEs Analisados	Nº de PCEMNs
Controle Negativo	M1	2000	5
	M2	2000	4
	M3	2000	5
	M4	2000	4
	M5	2000	4
	M6	2000	5
DMSO	M1	2000	5
	M2	2000	5
	M3	2000	6
	M4	2000	5
	M5	2000	7
	M6	2000	6
AA I	M1	2000	5
	M2	2000	5
	M3	2000	4
	M4	2000	5
	M5	2000	5
	M6	2000	5
AA II	M1	2000	5
	M2	2000	5
	M3	2000	5
	M4	2000	4
	M5	2000	6
	M6	2000	4
AA III	M1	2000	5
	M2	2000	4
	M3	2000	5
	M4	2000	5
	M5	2000	5
	M6	2000	4
DXR	M1	2000	44
	M2	2000	45
	M3	2000	47
	M4	2000	46
	M5	2000	48
	M6	2000	44

M, macho.

Tabela 11: Frequências de PCEMNs em sangue periférico de camundongos *Swiss* submetidos AA + DXR (grupos antígenotóxicos) após 48h em diferentes concentrações e seus respectivos controles.

Tratamento	Animal	Nº de PCEs Analisados	Nº de PCEMNs
Controle Negativo	M1	2000	5
	M2	2000	4
	M3	2000	5
	M4	2000	4
	M5	2000	4
	M6	2000	5
DXR	M1	2000	44
	M2	2000	45
	M3	2000	47
	M4	2000	46
	M5	2000	48
	M6	2000	44
DMSO + DXR	M1	2000	45
	M2	2000	45
	M3	2000	44
	M4	2000	44
	M5	2000	43
	M6	2000	46
AA I + DXR	M1	2000	20
	M2	2000	19
	M3	2000	20
	M4	2000	19
	M5	2000	19
	M6	2000	19
AA II + DXR	M1	2000	19
	M2	2000	19
	M3	2000	18
	M4	2000	19
	M5	2000	18
	M6	2000	18
AA III + DXR	M1	2000	19
	M2	2000	18
	M3	2000	19
	M4	2000	18
	M5	2000	19
	M6	2000	18

M, macho.

Os grupos que foram tratados com DMSO, tanto para teste de efeito genotóxico quanto para antigenotóxico em 24h e 48h, não apresentaram diferenças estatisticamente significantes ($P>0,05$), quando comparadas suas frequências de PCEMNs com as de seus respectivos controles.

Os resultados obtidos para os tratamentos em camundongos *Swiss* com diferentes doses de AA e/ou estes combinados à administração intraperitoneal de DXR na dosagem de 15 mg kg^{-1} de peso corporal e seus respectivos controles são mostrados na Tabela 12.

Tabela 12: Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) do sangue periférico de animais submetidos a tratamento de diferentes doses de AA e seus respectivos controles.

Tratamentos (mg kg^{-1} b.w.)	Total of PCEMNs		PCEMNs	Média \pm SD
	24 h	48 h	24 h	48 h
Controle	27	26	4.50 ± 0.55	4.33 ± 0.52
DMSO	31	34	5.16 ± 0.63	5.66 ± 0.82
AA I (500 mg)	29	29	5.16 ± 0.98	4.83 ± 0.41
AA II (1000 mg)	29	29	4.83 ± 0.75	4.83 ± 0.75
AA III (2000 mg)	28	28	4.66 ± 0.52	4.66 ± 0.52
DXR mg	171 ^a	274 ^a	28.50 ± 1.38	45.66 ± 1.63
DMSO + DXR	167 ^a	267 ^a	27.83 ± 0.75	44.66 ± 1.05
AA I + DXR	121 ^{a,b}	116 ^{a,b}	20.16 ± 1.16	19.33 ± 0.52
AA II + DXR	118 ^{a,b}	111 ^{a,b}	19.66 ± 1.03	18.50 ± 0.55
AA III + DXR	116 ^{a,b}	110 ^{a,b}	19.33 ± 1.37	18.33 ± 0.52

Um total de 2000 PCEs foram analisados por animal, para um total de 12 000 células por tratamento; DXR, doxorubicina (15 mg kg.p.c)

^a Diferença significativa para grupo controle ($P<0.05$).

^b Diferença significativa para o grupo DXR ($P<0.05$).

A administração simultânea de uma dose oral única por gavagem de cada concentração de óleo fixo de AA com injeção intraperitoneal de DXR resultou numa redução significativa de cerca de $36,57 \pm 1,74\%$ para os tratamentos de 24 h, e de $65,18 \pm 1,29\%$ para os de 48h, na frequência de PCEMNs, quando comparado com o grupo tratado apenas com DXR. O aumento gradual da concentração óleo fixo do AA demonstrou melhor efeito antígeno-tóxico quanto maior foi a dose utilizada, contudo, a análise estatística não apontou quaisquer relevância dessas diferenças nos resultados, indicando assim, ausência de uma relação dose-resposta tanto para os tratamentos de 24h quanto para os de 48h (Tabela 13).

A frequência de PCEMNs foi menor em animais tratados com DMSO+DXR do que nos tratados apenas com DXR, mas essas diferenças não foram estatisticamente significativas, e o IDN não apontou quaisquer indício de potencial citotóxico em todos os grupos avaliados (Tabela 13).

Tabela 13: Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs / 1000 PCEs) e IDN em sangue periférico de camundongos suíços tratados com *Astrocarium aculeatum* óleo fixo e DXR e seus respectivos controles 24 e 48 h pós-tratamento.

Tratamentos (kg p.c.)	IDN		PCEMNs/1000 PCEs		Redução (%)	
	24 h	48 h	24 h	48 h	24 h	48 h
Controle	0.011 ± 0.51	0.010 ± 0.51	2.25	2.16	-	-
DMSO	0.013 ± 0.54	0.011 ± 0.54	2.58	2.83	-	-
AA I	0.013 ± 0.54	0.011 ± 0.83	2.42	2.42	-	-
AA II	0.014 ± 0.75	0.013 ± 0.75	2.42	2.42	-	-
AA III	0.013 ± 0.83	0.013 ± 0.75	2.33	2.33	-	-
DXR	0.013 ± 1.03	0.012 ± 0.89	14.25	22.83	-	-
DMSO+DXR	0.013 ± 0.75	0.010 ± 0.51	14.08	22.25	-	-
AA I + DXR	0.012 ± 1.16	0.011 ± 0.81	11.33	9.66	34.72	63.70
AA II + DXR	0.013 ± 0.75	0.011 ± 0.83	10.08	9.25	36.80	65.72
AA III + DXR	0.012 ± 0.75	0.010 ± 0.51	9.66	9.16	38.19	66.12

Os resultados das frequências totais de PCEMNs de cada grupo, em 24h e 48h, estão ilustradas nos gráficos 01 e 02, respectivamente, e apresentam uma nítida relação entre valores aumentados nas frequências de PCEMNs dos grupos e a administração de DXR, visto que houve discrepância nos valores das frequência de todos os grupos que foram tratados com DXR quando comparado com os grupos que não receberam DXR.

Gráfico 01: Comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em células de sangue periférico de 24h de camundongos Swiss tratados com diferentes doses de AA e associados ou não a DXR, e seus respectivos controles.

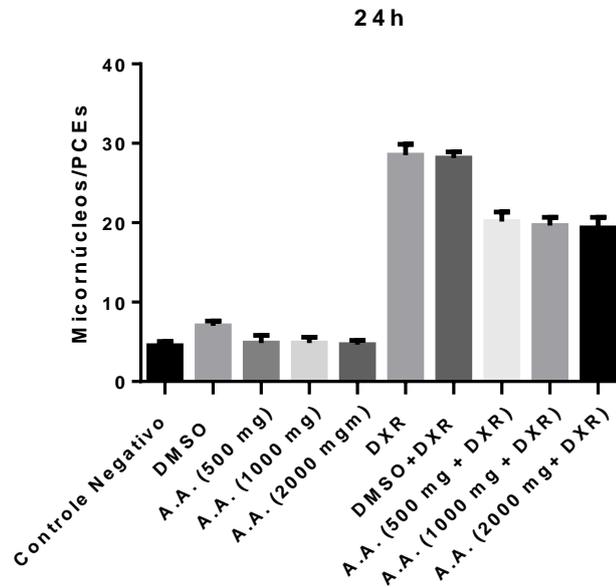
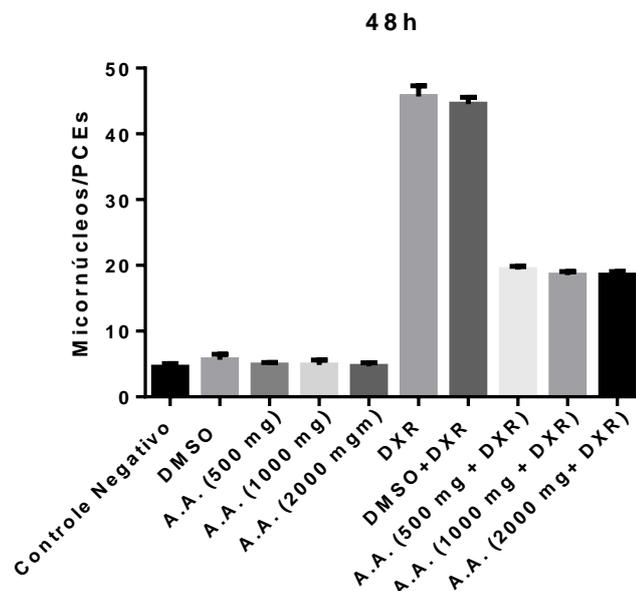


Gráfico 02: Comparação das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs) em as células de sangue periférico de 48h de camundongos Swiss tratados com diferentes doses de AA associados ou não a DXR, e seus respectivos controles.



DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

O presente estudo investigou o efeito genotóxico e antigenotóxico do óleo do tucumã, uma fruta amazônica rica em carotenóides e outros compostos bioativos como polifenóis. A avaliação foi feita por meio da indução de micronúcleos, que por sua vez, é um método padrão usado em citogenética toxicológica, sendo recomendado como parte da bateria de testes genotóxicos usados para avaliação da segurança de agentes químicos e físicos (KRISHNA, 2000; CAMMERER et al., 2007), assim, o teste do micronúcleo em eritrócitos do sangue periférico é satisfatório para a detecção de agentes capazes de induzir ou evitar danos cromossômico, podendo assim ser utilizado nos ensaios de genotoxicidade e antigenotoxicidade (GRAWE, 2005).

As características básicas do teste do micronúcleo são: o efeito do agente químico é observado em PCEs que tem um tempo de vida curto, de modo que qualquer micronúcleo que ela tenha pode ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; os micronúcleos são facilmente identificáveis e sua distribuição é bem definida; e a frequência de micronúcleo induzido em PCEs é dependente do tempo de amostragem (RIBEIRO, 2003).

Camundongos e ratos podem ser utilizados no teste do micronúcleo. O presente estudo utilizou camundongos Swiss, o que permitiu que quantidades menores de AA fossem utilizadas.

Segundo Abramsson-Zetterberg et al (1999), desde que camundongos têm sido usados como espécie modelo em estudos toxicológicos convencionais, os mesmos podem ter uma vantagem se o teste de micronúcleo for usado em paralelo com uma indicação de efeito mutagênico nesta espécie. No caso de uma exposição prolongada de camundongos, o qual é comum em testes toxicológicos, várias amostras de sangue periféricos são obtidas de vários tempos durante o experimento, para fornecer uma importante informação suplementar sobre o tempo decorrido da indução de micronúcleo. Nesse estudo o tempo de tratamento foi 48h.

Segundo Hayashi et al (2000) pelo menos quatro animais por grupo e 2.000 células analisadas por animal podem ser utilizados para determinar a incidência de

eritrócitos imaturos micronucleados. O presente estudo analisou 2.000 células por animal, sendo que cada grupo foi composto por seis camundongos Swiss, machos.

Neste estudo diferentes concentrações de AA foram administradas por gavagem. Por se tratar da via mais comum a qual o homem faz uso de produtos naturais inclusive de óleos naturais. A gavagem é indicada como a via normalmente usada para administração da substância-teste, sendo que as demais vias como injeções intraperitoneal e intravenosa, podem ser aceitas quando seu uso for justificado (PRESTON et al, 1987).

As doses e o período de amostragem têm papel importante no sistema teste empregado. Geralmente, pelo menos 3 doses são testadas. No referido estudo foi utilizada as doses de 500, 1.000 e 2.000mg/kg p. c. Estes valores foram utilizados de acordo com os protocolos internacionais os GUIDELINES, que indicam os mesmos, caso não haja estudos realizados que se aproximem dos testes realizados na pesquisa. Em relação ao tempo de amostragem, no teste de micronúcleos em sangue periférico varia entre 24, 48 e 72h sendo que o pico de resposta próximo a 48h após a administração, admitindo variações de algumas horas que se relacionam com o tipo de composto testado e de sua respectiva dose (CSGMT, 1995).

Esta pesquisa consistiu na coleta de sangue periférico extraído da cauda de cada animal após 24h e 48h, sendo que as alterações cromossômicas denotadas pelo aumento na frequência de PCEs foram mais acentuadas em 48h quando comparadas com as de 24h, corroborando com os princípios do CSGMT (1995).

O quimioterápico DXR, que foi utilizado neste trabalho como controle positivo, é um antibiótico antracíclico sendo um potente antitumor de amplo espectro frequentemente utilizando no tratamento de leucemia aguda, linfomas e tumores sólidos, como os de mama, ovário e endométrio em combinações com diferentes drogas. Sua toxicidade pode ser causada de maneiras diferentes: a sua porção agliconada planar, pode inserir-se entre pares de bases adjacentes no DNA, modificando a capacidade de helicases nucleares para dissociar a dupla fita de DNA e a enzima topoisomerase II atuando como agressor para esta enzima, subvertendo sua finalidade normal para induzir dano no DNA, que se dá pela perda de um ou dois elétrons, gerando assim compostos reativos com potencial de danificar macromoléculas e membranas lipídicas (INJAC e STRUKELJ, 2008).

Poucos minutos após a sua administração, o quimioterápico é removido do plasma e encontrado no núcleo da célula, onde se coloca entre pares de bases dos

ácidos nucleicos e exerce um efeito antimitótico. Por isso, a DXR é utilizada como indutor de micronúcleos, sendo frequentemente empregada em testes de mutagenicidade como controle positivo (ANTUNES; TAKAHASHI, 1998; TAVARES et al., 1998), o que mostra estar de acordo com o referido estudo, observando os valores sobre a quantidade de micronúcleos encontrados no controle positivo – DXR, sendo os mesmos 171 e 274 totais de PCEMNs para 24h e 48h respectivamente. A DXR é relatada em ser metabolicamente ativada para um estado de radical livre que interage com oxigênio molecular para a geração de radicais superóxidos (POWIS, 1989).

A produção de radicais livres é considerada o principal mecanismo de seu potencial tóxico (QUILIS et al., 2002), resultando em estresse oxidativo que não obstante promove dano no DNA, levando eventualmente a mutações induzidas pelo efeito genotóxico do quimioterápico, que por sua vez, pode ser apreciado nesse trabalho pelo considerável aumento no número de micronúcleos por animal no grupo DXR, comparativamente, ao grupo controle negativo (água) e solvente (DMSO).

Dentre uma gama de compostos bioativos oriundos do tucumã e que são encontrados no AA, encontra-se os carotenóides, que por sua vez, além de serem responsáveis por sua cor amarelo-avermelhado estão relacionados com importantes funções e ações fisiológicas, sendo a mais conhecida a atividade, pró-vitamina A. A eliminação de radicais livres é fundamental para a saúde do organismo e este micronutriente é um antioxidante importante na proteção contra danos oxidativos causados pelos radicais livres gerados em vários processos metabólicos no corpo humano. (FERREIRA, 2007; ORUCH, 2012).

Atualmente, há consideráveis debates sobre qual valor real da vitamina A resultante de alimentos que contenham carotenoides, e qual é o poder de influência relativo de sua importância na biodisponibilidade destes carotenoides (AMBRÓSIO et al 2006). Ao mencionar biodisponibilidade de carotenóides, outros dois termos importantes são amplamente utilizados na literatura: bioconversão e bioeficácia. Bioconversão é a proporção biodisponível de carotenóides convertidos em vitamina A, enquanto bioeficácia é a eficiência com a qual os carotenoides ingeridos são absorvidos e convertidos em vitamina A (OLSON, 1999; AMBRÓSIO et al 2006).

Existem vários alimentos que são fontes de carotenóides, como a abóbora, cenoura, manga, batata doce, espinafre, tomate, mostarda, couve, entre outros. Entretanto, são os frutos de palmeiras como o buriti (*Mauritia vinifera*) o dendê

(*Elaeis guineensis*), e o tucumã (*Astrocaryum aculeatum*), que se destacam como as fontes mais ricas de provitamina A encontradas no Brasil (RODRIGUEZ-AMAYA, 1997).

Em um estudo em que foi avaliada a atividade de vitamina A do buriti, Mariath et al., (1989), concluíram que ocorreu reversão de xeroftalmia e elevação de reservas hepáticas da vitamina, sugerindo a possível utilização do buriti em programas de combate à deficiência de vitamina A.

O óleo de dendê e do tucumã vem sendo amplamente estudado como alternativa ao combate à hipovitaminose A, pois é inquestionável a potencialidade de ambos os óleos como fonte de carotenóides no combate à hipovitaminose A (MANORAMA e RUKMINI, 1991; MAHAPATRA e MANORAMA, 1997; CANFIELD e KAMINSKY, 2000; AMBRÓSIO et al 2006; FERREIRA, 2007).

Inúmeros estudos comprovam a correlação entre a ingestão de vegetais e frutos contendo carotenóides e prevenção de várias doenças crônico-degenerativas, tais como cancro, inflamação, doença cardiovascular, entre outros. Devido a todas essas ações benéficas, a composição de carotenóides em frutas e vegetais tem sido amplamente relatadas (KRINSKY; LANDRUM; BONE, 2003, COYNE et al 2005, BERG, 2000, FRASER, LEE e BINNS, 2005; STHAL e SIES, 2005).

Controvérsias no campo de investigação da associação entre o consumo de frutas, legumes e verduras e a maior proteção contra o desenvolvimento de câncer são inexpressivas. A literatura revela que a consensualidade tem prevalecido e tem sido sustentada por conclusões bastante convergentes, as quais, inclusive, têm justificado e subsidiado uma série de estratégias e movimentos, em todo o mundo, voltados ao estímulo do consumo de frutas, legumes e verduras (GOMES 2007).

Miller et al. (2005), realizaram um estudo alimentar randomizado controlado, com 103 adultos saudáveis com idades superiores a 21 anos de idade, os quais eram aleatoriamente alocados em diferentes grupos. Ao grupo controle, era ofertada uma dieta típica dos Estados Unidos; Dieta com alimentos ricos em carotenóides (frutas legumes e verduras) com reduzidas quantidades de gordura. O estudo demonstrou que o consumo de alimentos ricos em carotenóides com reduzidas quantidades de gordura reduziu o estresse oxidativo, e resultou em um aumento da concentração sérica de antioxidantes. E constatou-se, adicionalmente, que indivíduos que apresentaram os maiores incrementos em carotenóides séricos também experimentaram as maiores reduções em marcadores de lesão oxidativa.

Pool-Zobel et al. (1997), observaram que alimentos ricos em carotenoides possuem um efeito protetor contra o câncer, ocasionando redução de lesões ao DNA, identificadas, tanto pela redução da oxidação das bases pirimidínicas do DNA, quanto pelo menor número de quebras de fitas do DNA linfocítico; esse efeito também pôde ser evidenciado por Porrini & Riso (2000), por meio da suplementação com purê de tomate.

Existem, aproximadamente, 600 carotenóides encontrados na natureza, os quais são constituídos por dois grandes grupos, onde desse total, em média 60 podem ser encontrados nos alimentos, e como resultado de uma absorção seletiva do trato gastrintestinal, apenas 14 carotenoides são biodisponíveis, biodisponibilidade esta que se apresenta de forma quase ilimitada (KHACHIK, 1991; PARKER, 1999).

Entre esses se encontram, o alfa-caroteno, a luteína, a zeaxantina, o licopeno; a beta-criptoxantina, a fucoxantina, a astaxantina, a crocetina, a capsantina, o fitoeno, carotenóides em geral com destaque para o β -caroteno, que é muito promissor no que se refere à proteção contra o câncer. Apesar dos carotenóides, em especial o β -caroteno, que é o carotenóide com maior potencial antioxidante, serem alvo de bastante estudo, ainda existem poucos estudos que se foquem nos carotenóides como proposta de tratamento para o câncer (GOMES, 2007).

Entretanto, apesar da variabilidade em compostos bioativos de diferentes naturezas, presentes no fruto, e da escassez de estudos em relação a ao β -caroteno frente ao câncer, o protagonismo dos benefícios advindos do tucumã, podem ser atribuídos às propriedades antioxidantes distintas dos vários carotenóides presentes no tucumã, o qual, das 60 espécies de carotenóides listadas por De Rosso e Mercadante, 2007, presentes em diferentes frutos, 24 foram encontrados no tucumã onde destes, 21 foram quimicamente identificados.

As análises de De Rosso e Mercadante (2007), demonstraram que o tucumã oferece uma das mais altas concentrações de pró-vitamina A das fontes conhecidas, sendo 52 mg/100 g de polpa. Esta concentração é de cerca de oito vezes mais elevadas do que o encontrado na cenoura (6,6 mg / 100 g de polpa), considerada uma rica fonte nutritiva em carotenos.

É válido ressaltar que De Rosso e Mercadante, (2007) e Gonçalves et al., (2010), associaram o carotenóides entre outros compostos presentes no tucumã à

eliminação de radicais livres. Esses achados encontram-se em consonância com esta pesquisa, pois o AA é rico em carotenóides e flavonoides, ambos compostos reconhecidamente antioxidantes pela literatura. Contudo, alguns estudos relatam que concentração de β -caroteno influencia sua ação antioxidante, de modo que em altas concentrações prejudicam sua habilidade protetora e/ou a reverterem em pró-oxidativa, o que em última análise poderia, promover uma lesão de material genético, efeito este não observando no presente estudo já que a maior concentração utilizada foi de 2.000 mg/kg p. c., e apresentou resultado satisfatório em ambos os tempos avaliados (LOWE et al., 1999; WOODS, BILTON, YOUNG, 1999; KRINSKY, 2001).

Além dos carotenoides, entre os quais se destaca o β -caroteno, compostos bioativos como polifenóis, os quais se destacam os flavonóides, são reconhecidamente substâncias com alto poder antioxidante (MARTINEZ-VALVERDE et al., 2000).

Os flavonoides, são substâncias naturais amplamente distribuídas no Reino Vegetal. Sua biodisponibilidade e os fatores interferentes vêm sendo amplamente estudados. Nota-se um interesse crescente na investigação dessas substâncias, devido ao volume de evidência dos benefícios que eles proporcionam para a saúde, pois o consumo de alimentos ricos em polifenóis, incluindo os flavonoides (BEHLING et al., 2004; BECHO et al., 2010).

A cinética de absorção dos flavonoides varia consideravelmente entre os alimentos devido a heterogeneidade de açúcares e outros grupos funcionais ligados ao núcleo de flavonas (WALLE, 2004). Os flavonóides são usualmente absorvidos, passando pelos enterócitos, após serem glicosilado e/ou convertidos em agliconas por glicosidases presentes na mucosa gastrointestinal e microflora do cólon (HOLLMAN et al., 1997; LE MARCHAND, 2002).

Após sua absorção eles são conjugados no intestino delgado e no fígado pela glicuronidação, sulfatação ou metilação ou metabolizados a pequenos compostos fenólicos (MACHADO, 2005). Ao sofrerem estas modificações, os flavonóides podem tornar-se metabólitos mais ativos ou serem eliminados do organismo mais facilmente por tornarem-se mais polares, assim, muitos desses produtos metabólicos podem ser detectados na urina e fezes humanas (WALLE, 2004).

Os flavonóides são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades seqüestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos (KANDASWAMI e

MIDDLETON, 1994), protegendo assim os tecidos dos radicais livres e da peroxidação lipídica. A propriedade antioxidante é direcionada sobre o radical hidroxil ($\bullet\text{OH}$) e o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) que são espécies altamente reativas envolvidas na iniciação da peroxidação lipídica. Além destes efeitos importantes, os flavonóides têm propriedades estabilizadoras de membrana (GALATI et al., 2002).

Particularmente, a quercetina sequestra radicais de oxigênio como inibe a xantina oxidase e a peroxidação lipídica (KAHRAMAN et al., 2003). A quercetina é conhecida também por suas propriedades quelante e estabilizadora do ferro (SORATA et al., 1984).

Muitos mecanismos antioxidantes têm sido propostos para os flavonoides como: a) opressão da formação de EROs pela inibição do sistema enzimático responsável pela geração de radicais livres (ciclooxigenase, lipoxigenase ou xantina oxidase); b) quelação de íons metálicos; c) seqüestro de radicais livres; d) induzir a fase II de enzimas como glutatona transferase que aumenta a excreção EROs; e) indução de enzimas antioxidantes como a metalotioneína (MIDDLETON et al., 2000; PIETTA, 2000).

A quercetina pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos) (AFANAS' EV et al, 1989).

Embora os flavonóides apresentem propriedades antioxidantes importantes na prevenção de doenças, alguns estudos têm demonstrado uma atividade pró-oxidante *in vitro*. Extratos concentrados de plantas ricas em flavonóides como própolis, folhas de chá verde, isoflavonas isoladas da soja e semente de uva, são amplamente difundidos como nutracêuticos para o tratamento de doenças cardiovasculares, câncer e inflamações crônicas (BEHLING et al 2004).

Pelo o exposto, o presente estudo está de acordo com a literatura que reconhece o potencial protetor dos compostos oriundos do tucumã em células expostas a EROs, pois os resultados obtidos nesta pesquisa a partir de avaliações de grupos que utilizaram AA associados a DXR para teste de efeito antígeno-tóxico, apontaram uma redução significativa de médias $36,57 \pm 1,74\%$ para os tratamentos de 24h, e $65,18 \pm 1,29\%$ para os de 48h, na frequência de PCEMNs quando comparado com o grupo controle positivo que utilizou exclusivamente a DXR, para promover estresse celular.

A maior dosagem utilizada na presente pesquisa foi de 2000 mg p. c. e não apresentou qualquer indício de prejuízo no desempenho antígeno-tóxico, avaliado neste estudo, desempenho esse que reflete invariavelmente o potencial antioxidante do AA.

Não obstante, a demonstração desse efeito, indica que suplementações com altas doses de micronutrientes devem ser atentamente acompanhadas pelos estudos, como em qualquer intervenção farmacológica (GOODMAN et al., 2003).

É importante salientar, que apesar da grande relevância das propriedades terapêuticas dos carotenoides, presentes no AA, compostos bioativos como polifenóis são importantes atores do desempenho do papel antioxidante do fruto, potencializando, seus efeitos. Flavonóides, em especial a quercetina, estão presentes em abundância no tucumã, e estão sendo amplamente estudados na última década, por apresentarem relevante efeito antioxidante, importante potencial anticancerígeno, além de efeito protetor ao sistema renal, cardiovascular e hepático (SAGRILLO et al, 2015).

Até mesmo, propriedades antimicrobianas oriundas do tucumã são relatadas por Sagrillo (2015), provavelmente, o efeito antimicrobiano do fruto está associado à sua composição química, que inclui vários tipos de moléculas de polifenóis, pois segundo Daglia (2012) e Jobim et al (2014), estes metabólitos secundários, são produzidos por plantas superiores e apresentam propriedades antibacterianas, antivirais e antifúngicas.

Jobim et al., (2014) investigaram a atividade antimicrobiana do tucumã contra 37 microorganismos, em um estudo de biofilme. Seus resultados mostraram efeito antibacteriano de extratos hidro-alcoólicos de polpa e casca de tucumã em três bactérias Gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Bacillus cereus*, *Listeria monocytogenes*) e efeito antifúngico contra *Candida albicans*. E concluiu que os extratos de tucumã apresentam atividade antimicrobiana para quatro microorganismos que apresentam grandes problemas de resistência a fármacos.

Os resultados observados no presente estudo, estão provavelmente relacionados com moléculas antioxidantes encontrados no óleo fixo, provavelmente protagonizado pelos carotenóides e potencializados pelos flavonóides. O potencial protetor do fruto a stress oxidativo ao DNA da célula, se deve a capacidade antioxidante resultante das interações físico-químicas geradas pela interação destes antioxidantes com a estrutura das membranas biológicas (BÖHM ET AL., 2012).

Desta forma, são importantes para a atividade antioxidante, comunicação intercelular e atividade do sistema imunológico (SKIBSTED, 2012 E STEPHENSEN, 2013).

As moléculas bioativas presentes no tucumã apresentam em sua variedade grande capacidade antioxidante. No entanto, a rica concentração de moléculas antioxidantes no óleo fixo do tucumã não é por si só garantia de que o óleo seja capaz reverter completamente o stress oxidativo num organismo vivo exposto a moléculas que podem causar dano no conteúdo genético das células, como o quimioterápico utilizado nesta pesquisa, a DXR, o que é corroborado pelos estudos de Sagrillo et al., (2015).

Neste sentido, os resultados demonstraram uma relevante reversão do stress oxidativo celular indicando considerável potencial preventivo a dano no DNA celular pelo AA, tanto para os tratamentos de 24h quanto para os de 48h, para os grupos que testaram o efeito antigenotóxico do óleo.

Todavia, apesar dos tratamentos dos grupos genotóxicos apresentarem relevante potencial protetor ao DNA da célula após 24h, nota-se um melhor desempenho protetor do AA após 48h.

Vale ressaltar que os resultados para verificação de efeito genotóxico para as três concentrações testadas (A.A I 500 mg, A.A II 1000 mg e A.A III 2000 mg) bem como o grupo DMSO quando comparados com o grupo controle negativo, denotaram ausência de efeito tóxico ao DNA, pois não houve diferença significativamente relevante à análise estatística ($P < 0,05$) assim como ausência de efeito citotóxico demonstrado através dos resultados apresentados pelo IDN de cada grupo.

Os resultados desta pesquisa, encontram força na literatura, onde diferentes concentrações de AA apresentaram efeito protetor as células ao stress oxidativo, por ação dos carotenóides, tais como β -caroteno, em consonância com flavonoides, tais como quercetina e rutina, atuando em conjunto como indutor do aumento da resistência a danos oxidativos ao DNA (SAGRILLO et al, 2015).

Não existem outros estudos publicados que avaliem o efeito genotóxico do Tucumã in vivo para confrontar os resultados deste trabalho, o que torna este estudo pioneiro e referência para investigações futuras. Contudo Olmiro, 2013 em seus achados, ao testar in vitro pelo ensaio cometa, os efeitos genotóxicos do tucumã em células mononucleadas do sangue periférico humano (PBMC), sugeriu relativo efeito

genotóxico em concentrações superiores a 500 ug/mg, mas reconhece as limitações metodológicas relacionadas a seu próprio estudo, dando destaque a existência apenas de protocolos *in vitro* para analisar o potencial efeito genotóxico do tucumã, e por isso, adverte, que seus resultados não podem ser diretamente transferidos para modelos *in vivo*.

Sagrillo et al., (2015), por sua vez, ao testar com extratos da polpa e da casca do Tucumã em seis concentrações diferentes (100, 300, 600, 900, 1200, e 1500 ug / ml) para tratar stress oxidativo induzido em culturas de células de linfócitos humanos, obteve melhores resultados com efeitos antioxidantes nas menores concentrações testadas.

Estes resultados não confrontam necessariamente os achados desta pesquisa, mesmo este estudo não encontrando diferenças significativas na efetividade do efeito protetor ao DNA para as diferentes dosagens testadas de AA em ambos os momentos de 24h e 48h, pois o estudo de Sagrillo, (2015), trata-se de modelo *in vitro* e a concentrações não foram as mesmas utilizadas nesse estudo, não permitindo uma adequada correspondência de dosagens.

CONCLUSÃO

As conclusões sobre a obtenção do AA e sua avaliação genotóxica e/ou antigenotóxica *in vivo* com tratamento agudo em camundongos Swiss, estão descritas a seguir:

- As frequências de PCEMNs e obtidas nos animais tratados com AA foram semelhantes àqueles ao controle negativo, mostrando assim ausência de efeito genotóxico.
- Houve uma redução estatisticamente significativa nas frequências de PCEMNs nos animais submetidos aos tratamentos com diferentes concentrações de AA associados ao grupo DXR em relação aos animais tratados somente com DXR, demonstrando efeito antigenotóxico.
- A redução na frequência de PCEMNs observadas nos grupos tratados com as diferentes concentrações de AA associados ao DXR não apresentaram diferenças estatisticamente significante entre si, revelando ausência de efeito dose-resposta, tanto para 24h quanto para 48h.
- As frequências de PCEMNs observadas nos grupos tratados com DMSO, não apresentaram diferenças estatisticamente significante quando comparadas com seus respectivos controles, demonstrando que o solvente utilizado não provocou viés nos resultados da pesquisa.
- Os valores de IDN (*in vivo*) não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos tratados com diferentes concentrações de AA, DMSO e DXR quando comparadas com o grupo controle negativo, revelando ausência de citotoxicidade.

REFERÊNCIAS

ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; GRAWÉ, J.; ZETTERBERG, G. The micronucleus test in rat erythrocytes from bone marrow, spleen and peripheral blood: the response to low doses of ionizing radiation, cyclophosphamide and vincristine determined by flow cytometry. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 423, n. 1, p. 113-124, 1999.

AGOSTINI, J. M. S. O teste do micronúcleo: seu uso no Homem. **Biotemas**, v. 6, n. 2, p. 1-19, 1993.

AFANAS' EV, I. B. et al. Chelating and free radical scavenging mechanisms of inhibitory action of rutin and quercetin in lipid peroxidation. **Biochemical pharmacology**, v. 38, n. 11, p. 1763-1769, 1989.

AMBRÓSIO, C. L. B. et al. Carotenóides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos-uma breve revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 66, n. 1, p. 01-09, 2007.

ANTUNES, L. M. G. ; TAKAHASHI, C. S. Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 419, n. 1, p. 137-143, 1998.

BACELAR-LIMA, C. G.; MENDONÇA, M. S; T. S. BARBOSA T. C. Morfologia floral de uma população de tucumã *Astrocaryum aculeatum* G. Mey (Arecaceae) na Amazônia central. **Acta Amazonica**, v. 36, n. 4, p. 407-412, 2006.

BACELAR-LIMA, C. G.; COLETTTO-SILVA, A.; GRIBEL, R. Biologia floral e visitantes de *Astrocaryum aculeatum* Meyer (Arecaceae) em Manaus, AM, Brasil. In: **Congresso Nacional de Botânica**. Belém: UFRAMPEGEMBRAPA Amazônia Oriental, 2003.

BARREIROS, A. L. B. S.; DAVID, J. M.; DAVID, J. P. Estresse oxidativo: relação entre geração de espécies reativas e defesa do organismo. **Química nova**, v. 29, n. 1, p. 113, 2006.

BALANDRIN, M. F. et al. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. **Science**, v. 228, n. 4704, p. 1154-1159, 1985.

BAXTER, H.; HARBORNE, J. B.; MOSS, G. P. **Phytochemical dictionary: a handbook of bioactive compounds from plants**. 1998.

BECHO, J. R. M; MACHADO, H.; DE OLIVEIRA M. G. Rutina—estrutura, metabolismo e potencial farmacológico. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais-Animais e Humanos Interdisciplinary Journal of Experimental Studies**, v. 1, n. 1, 2010.

BEHLING, E. B., et al. Flavonóide quercetina: aspectos gerais e ações biológicas. **Alimentos e Nutrição**, v. 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BIRCH, A. E., et al. Antioxidant properties of evening primrose seed extracts. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 49, n. 9, p. 4502-4507, 2001.

BÖHM, F.; EDGE, R.; GEORGE, T. Interactions of dietary carotenoids with singlet oxygen (1O_2) and free radicals: potential effects for human health. **Acta Biochimica Polonica**, v. 59, n. 1, p. 27, 2012.

BRAVO, L. Polyphenols: chemistry, dietary sources, metabolism, and nutritional significance. **Nutrition reviews**, v. 56, n. 11, p. 317-333, 1998.

BRENNA, O. V.; PAGLIARINI, E. Multivariate analysis of antioxidant power and polyphenolic composition in red wines. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4841-4844, 2001.

BRUBACHER, G. B.; WEISER, H. The vitamin A activity of beta-carotene. **International journal for vitamin and nutrition research**. v. 55, n. 1, p. 5-15, 1984.

CAMMERER, Z. et al. Comparison of the peripheral blood micronucleus test using flow cytometry in rat and mouse exposed to aneugens after single-dose applications. **Mutagenesis**, v. 22, n. 2, p. 129-134, 2007.

CANFIELD, L. M.; KAMINSKY, R. G. Red palm oil in the maternal diet improves the vitamin A status of lactating mothers and their infants. **Food and Nutrition Bulletin**, v. 21, n. 2, p. 144-148, 2000.

CIMPOIU, C. Analysis of Some Natural Antioxidants by Thin-Layer Chromatography and High Performance Thin-Layer Chromatography. **Journal of liquid chromatography & related technologies**, v. 29, n. 7-8, p. 1125-1142, 2006.

COUTINHO, M. A. S.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 2009.

COYNE, T. et al. Diabetes mellitus and serum carotenoids: findings of a population-based study in Queensland, Australia. **The American journal of clinical nutrition**, v. 82, n. 3, p. 685-693, 2005.

CSGMT (The Collaborative Study Group for the Micronucleus Test Protocol Recommended by the CSGMT/JEMS.MMS for the short-term mouse peripheral blood micronucleus test. (CSGMT/JEMS.MMS, The Mammalian Mutagenesis, Study Group of the Environmental Mutagen Society of Japan). **Mutagenesis**, v. 10, p. 153-159, 1995.

DA SILVA, F. C. et al. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica FAEMA**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2011.

DAGLIA, M. Polyphenols as antimicrobial agents. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 174-181, 2012.

FENECH, M. Important variables that influence base-line micronucleus frequency in cytokinesis-blocked lymphocytes-a biomarker for DNA damage in human populations. **Mutation Research**. v. 404, p. 155-165, 1998.

FERREIRA et al. Caracterização físico-química do fruto e do óleo extraído do Tucumã (*Astrocaryum vulgare* Mart). **Alimentos e Nutrição**. Araraquara. v. 19, n. 4, p. 427-433, 2008.

FERREIRA, S. A. & GENTIL, D. F. Extração, embebição e germinação de sementes de tucumã (*Astrocaryum aculeatum*). **ACTA Amazônica**. v. 36. n. 2, p. 141-146, 2006.

FRANKE, S. I. et al. Possible repair action of vitamin C on DNA damage induced by methylmethanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ in mouse blood cells in vitro. **Mutation Research**. V. 583, p. 75-84, 2005.

GADOTTI, V. M. et al. Antinociceptive action of the extract and the flavonoid quercitrin isolated from *Bauhinia microstachya* leaves. **Journal of pharmacy and pharmacology**, v. 57, n. 10, p. 1345-1351, 2005.

GALATI, G. et al. Prooxidant activity and cellular effects of the phenoxyl radicals of dietary flavonoids and other polyphenolics. **Toxicology**, v. 177, n. 1, p. 91-104, 2002.

GOGTAY, N. J. et al. The use and safety of non-allopathic Indian medicines. **Drug safety**, v. 25, n. 14, p. 1005-1019, 2002.

GOMES, F. da S. Carotenóides: uma possível proteção contra o desenvolvimento de câncer. **Revista de nutrição**, v. 20, n. 5, p. 537-548, 2007.

GONÇALVES, A. E. de S. S. Maria Inés Genovese. Avaliação da capacidade antioxidante de frutas e polpas de frutas nativas e determinação dos teores de flavonoides e vitamina C. **Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)** - Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos - PPCA, Universidade de São Paulo São Paulo, 88 p., 2008.

GOODMAN, G. E. et al. The association between lung and prostate cancer risk, and serum micronutrients. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 12, n. 6, p. 518-526, 2003.

HAEGELE, A. D. et al. Plasma xanthophyll carotenoids correlate inversely with indices of oxidative DNA damage and lipid peroxidation. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 9, n. 4, p. 421-425, 2000.

HARBORNE, J. B. General procedures and measurement of total phenolics. **Methods in plant biochemistry**, v. 1, p. 1-28, 1989.

HAYASHI, M. et al. 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**, v. 35, n. 3, p. 234-252, 2000.

HOLLMAN, P. C. et al. Absorption of dietary quercetin glycosides and quercetin in healthy ileostomy volunteers. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1276-1282, 1995.

HOLLMAN, P. C. H. et al. Relative bioavailability of the antioxidant flavonoid quercetin from various foods in man. **FEBS letters**, v. 418, n. 1-2, p. 152-156, 1997.

<http://www.arara.fr/BBTUCUMA.html>, 2015. **Acessado em 03 de janeiro de 2017.**

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

JOBIM, M. L. et al. Antimicrobial activity of Amazon *Astrocaryum aculeatum* extracts and its association to oxidative metabolism. **Microbiological research**, v. 169, n. 4, p. 314-323, 2014.

KAHN, F.; MOUSSA, F. El papel de los grupos humanos en la distribución geográfica de algunas palmas en la Amazonía y su periferia. Uso y manejo de recursos vegetales. **Ediciones Abya-Yala**. Quito, p. 83-99, 1997.

KAHRAMAN, A. et al. Protective effect of quercetin on renal ischemia/reperfusion injury in rats. **Journal of nephrology**, v. 16, n. 2, p. 219-224, 2003.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON JR, E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. In: Free radicals in diagnostic medicine. **Springer US**, p. 351-376, 1994.

KHACHIK, F. et al. Separation, identification, and quantification of carotenoids in fruits, vegetables and human plasma by high performance liquid chromatography. **Pure and Applied Chemistry**, v. 63, n. 1, p. 71-80, 1991.

KING, A; YOUNG, G. Characteristics and occurrence of phenolic phytochemicals. **Journal of the American Dietetic Association**, v. 99, n. 2, p. 213-218, 1999.

KRISHNA, G; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 155-166, 2000.

KRINSKY, N. I. Carotenoids as antioxidants. **Nutrition**, v. 17, n. 10, p. 815-817, 2001.

KRINSKY, N. I.; YEUM, K. Carotenoid–radical interactions. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 305, n. 3, p. 754-760, 2003.

LE MARCHAND, L. Cancer preventive effects of flavonoids—a review. **Biomedicine & pharmacotherapy**, v. 56, n. 6, p. 296-301, 2002.

LOWE, G. M. et al. Carotenoid composition and antioxidant potential in subfractions of human low-density lipoprotein. **Annals of Clinical Biochemistry: An international journal of biochemistry in medicine**, v. 36, n. 3, p. 323-332, 1999.

MACGREGOR, J. T.; CASCIANO, Daniel; MÜLLER, Lutz. Strategies and testing methods for identifying mutagenic risks. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 455, n. 1, p. 3-20, 2000.

MACIEL, M. A. M. et al. Plantas medicinais: a necessidade de estudos multidisciplinares. **Química nova**, v. 25, n. 3, p. 429-438, 2002.

MAHAPATRA, S.; MANORAMA, R. The protective effect of red palm oil in comparison with massive vitamin A dose in combating vitamin A deficiency in Orissa, India. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 6, p. 246-50, 1997.

MAHOMOODALLY, M. F.; GURIB-FAKIM, A.; SUBRATTY, A. H. Screening for alternative antibiotics: an investigation into the antimicrobial activities of medicinal food plants of Mauritius. **Journal of food science**, v. 75, n. 3, p. M173-M177, 2010.

MANACH, C. et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. **FEBS letters**, v. 426, n. 3, p. 331-336, 1998.

MANORAMA, R.; RUKMINI, C. Effect of processing on β -carotene retention in crude palm oil and its products. **Food Chemistry**, v. 42, n. 3, p. 253-264, 1991.

MARIATH, J. G.; LIMA, M. C.; SANTOS, L. M. Vitamin A activity of buriti (*Mauritia vinifera* Mart) and its effectiveness in the treatment and prevention of xerophthalmia. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 49, n. 5, p. 849-853, 1989.

MARTINEZ-VALVERDE, I.; PERIAGO, M. J.; ROS, G. Significado nutricional de los compuestos fenólicos de la dieta. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 50, n. 1, p. 5-18, 2000.

MATTHEWS, H. B.; LUCIER, G. W.; FISHER, K. D. Medicinal herbs in the United States: research needs. **Environmental Health Perspectives**, v. 107, n. 10, p. 773, 1999.

MELO, E. de A.; GUERRA, N. B. Ação antioxidante de compostos fenólicos naturalmente presentes em alimentos. **Boletim da Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 36, n. 1, p. 1-11, 2002.

MILLER, E. R. et al. A dietary pattern that lowers oxidative stress increases antibodies to oxidized LDL: results from a randomized controlled feeding study. **Atherosclerosis**, v. 183, n. 1, p. 175-182, 2005.

MIDDLETON, E.; KANDASWAMI, C.; THEOHARIDES, T. C. The effects of plant flavonoids on mammalian cells: implications for inflammation, heart disease, and cancer. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 4, p. 673-751, 2000.

MILLÁN, B.; KAHN, F. Caracterización de la anatomía foliar de especies de *Astrocaryum* y *Hexopetion* (Arecaceae). **Revista Peruana de Biología**, v. 17, n. 1, p. 81-94, 2010.

NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, v. 1054, n. 1, p. 95-111, 2004.

OLSON, J. A. Bioavailability of carotenoids. **Archivos latinoamericanos de nutrición**, v. 49, n. 3 Suppl 1, p. 21S-25S, 1999.

PANNALA, A. S. et al. Flavonoid B-ring chemistry and antioxidant activity: fast reaction kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161-1168, 2001.

PARKER, R. S. et al. Bioavailability of carotenoids in human subjects. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 58, n. 01, p. 155-162, 1999.

PIETTA, P. G. Flavonoids as antioxidants. **Journal of natural products**, v. 63, n. 7, p. 1035-1042, 2000.

POOL-ZOBEL, B. L. et al. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis**, v. 18, n. 9, p. 1847-1850, 1997.

PORRINI, M.; RISO, P. Lymphocyte lycopene concentration and DNA protection from oxidative damage is increased in women after a short period of tomato consumption. **The Journal of nutrition**, v. 130, n. 2, p. 189-192, 2000.

POWIS, G. Free radical formation by antitumor quinones. **Free radical biology and medicine**, v. 6, n. 1, p. 63-101, 1989.

PRESTON, R. J. et al. Mammalian in vivo cytogenetic assays analysis of chromosome aberrations in bone marrow cells. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 2, p. 157-165, 1987.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Canoas: ed. ULBRA, 2003.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E. A. G. Química de alimentos. **São Paulo. Editora Edgar Blücher Ltda**, 2004.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids and food preparation: the retention of provitamin A carotenoids in prepared, processed and stored foods. **Arlington, VA: John Snow Incorporated/OMNI Project**, 1997.

RÖMER, S.; FRASER, P. D. Recent advances in carotenoid biosynthesis, regulation and manipulation. **Planta**, v. 221, n. 3, p. 305-308, 2005.

SAGRILLO, M. R. et al. Tucuma fruit extracts (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) decrease cytotoxic effects of hydrogen peroxide on human lymphocytes. **Food chemistry**, v. 173, p. 741-748, 2015.

SANTOS, R. I. Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. **Farmacognosia: da planta ao medicamento. 5. ed.** Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS/Editora da UFSC. p. 403-434, p. 403, 2003.

SESINK, A. L. A.; O'LEARY, K. A.; HOLLMAN, P. C. H. Quercetin glucuronides but not glucosides are present in human plasma after consumption of quercetin-3-glucoside or quercetin-4'-glucoside. **The Journal of nutrition**, v. 131, n. 7, p. 1938-1941, 2001.

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, beta-carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American journal of clinical nutrition**, v. 62, n. 6, p. 1315S-1321S, 1995.

SIMÃO, A. M. Aditivos para alimentos sob o aspecto tecnológico. **Nobel**. São Paulo, 1985.

SHAHIDI, F. **Natural antioxidants: chemistry, health effects, and applications.** The American Oil Chemists Society, 1997.

SKIBSTED, L. H. Carotenoids in antioxidant networks. Colorants or radical scavengers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2409-2417, 2012.

SORATA, Y; TAKAHAMA, U.; KIMURA, M. Protective effect of quercetin and rutin on photosensitized lysis of human erythrocytes in the presence of hematoporphyrin. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects**, v. 799, n. 3, p. 313-317, 1984.

STAHL, W; SIES, H. Antioxidant activity of carotenoids. **Molecular aspects of medicine**, v. 24, n. 6, p. 345-351, 2003.

STAHL, W; SIES, H. Bioactivity and protective effects of natural carotenoids. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1740, n. 2, p. 101-107, 2005.

STEPHENSON, C. B. Provitamin A carotenoids and immune function. In: Carotenoids and Human Health. **Humana Press**. p. 261-270, 2013.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. Metabólitos secundários e defesa vegetal. **Fisiologia Vegetal 3ªed**, p. 309-334, 2004.

TAVARES, D. C. et al. Protective effects of the amino acid glutamine and of ascorbic acid against chromosomal damage induced by doxorubicin in mammalian cells. **Teratogenesis, carcinogenesis, and mutagenesis**, v. 18, n. 4, p. 153-161, 1998.

TOMÁS-BARBERÁN, F. A. et al. HPLC– DAD– ESIMS analysis of phenolic compounds in nectarines, peaches, and plums. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4748-4760, 2001.

WALLE, T. et al. High absorption but very low bioavailability of oral resveratrol in humans. **Drug metabolism and disposition**, v. 32, n. 12, p. 1377-1382, 2004.

WATERS, M. D. et al. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

WANG, S. Y.; ZHENG, W. Effect of plant growth temperature on antioxidant capacity in strawberry. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 10, p. 4977-4982, 2001.

WATANABE, M. Catechins as antioxidants from buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) groats. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, n. 3, p. 839-845, 1998.

WILLCOX, J. K.; ASH, S. L.; CATIGNANI, G. L. Antioxidants and prevention of chronic disease. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 44, n. 4, p. 275-295, 2004.

WOODS, J. A.; BILTON, R. F.; YOUNG, A. J. β -Carotene enhances hydrogen peroxide-induced DNA damage in human hepatocellular HepG2 Cells. **FEBS letters**, v. 449, n. 2-3, p. 255-258, 1999.

VASCONCELOS, B. E. C. Avaliação das características físicas, químicas e nutricionais dos óleos do tucumã (*astrocaryum aculeatum* e *astrocaryum vulgare*) obtidos com co2 pressurizado. **Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)**, Universidade Federal do Pará - UFPA, 109 p., 2010.

VAN ACKER, S. A. B. E. et al. Structural aspects of antioxidant activity of flavonoids. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 20, n. 3, p. 331-342, 1996.

VAN DEN BERG, H. et al. The potential for the improvement of carotenoid levels in foods and the likely systemic effects. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 80, n. 7, p. 880-912, 2000.

VAN DER SLUIS, A. A. et al. Activity and concentration of polyphenolic antioxidants in apple: effect of cultivar, harvest year, and storage conditions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 8, p. 3606-3613, 2001.

VENKATESH, P. et al. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: A Micronucleus Study. **Integrative Cancer therapies**. v. 6, p. 42-53, 2007.

VINSON, J. A. et al. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5315-5321, 2001.

YAMAMOTO, K. I.; KIKUCHI, Y. Studies on micronuclei time response and on the effects of multiple treatments of mutagens on induction of micronuclei. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 90, n. 2, p. 163-173, 1981.

YAO, L. H. et al. Flavonoids in food and their health benefits. **Plant foods for human nutrition**, v. 59, n. 3, p. 113-122, 2004.

YILDIRIM, A.; MAVI, A.; KARA, A. A. Antioxidant and antimicrobial activities of *Polygonum cognatum* Meissn extracts. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, n. 1, p. 64-69, 2003.

YUYAMA, L. K. et al. Processamento e avaliação da vida-de-prateleira do tucumã (*Astrocaryum aculeatum* Meyer) desidratado e pulverizado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**. v. 28, n. 2, p, 408-412, 2008.

ZHENG, W.; WANG, S. Y. Antioxidant activity and phenolic compounds in selected herbs. **Journal of Agricultural and Food chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5165-5170, 2001.



UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

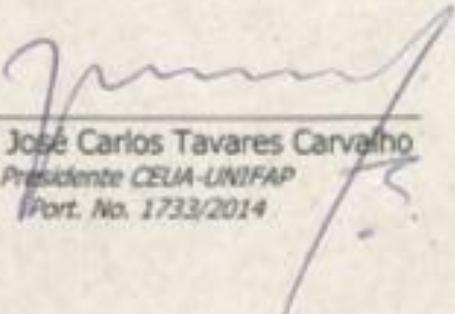
CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na reunião de 01 de julho de 2015, o parecer referente ao protocolo no. **0012/2015** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado **"Obtenção do óleo da *Astrocaryum aculeatum* (tucumã) e sua avaliação genotóxica e/ou antigenotóxica *in vivo* com tratamentos agudo e sub-agudo em camundongo *swiss*"** coordenado por **Alan Bruno Aurélio Carneiro**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 01 July 2015, the final decision about the Protocol **0012/2015** and certify that the research project entitled **"Obtenção do óleo da *Astrocaryum aculeatum* (tucumã) e sua avaliação genotóxica e/ou antigenotóxica *in vivo* com tratamentos agudo e sub-agudo em camundongo *swiss*"** coordinated by **Alan Bruno Aurélio Carneiro**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 01 de julho de 2015


Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014