

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Avaliação da atividade antimutagênica do  
beta-caroteno microencapsulado em células de ratos  
tratados com o antitumoral doxorrubicina  
empregando os ensaios de micronúcleo e cometa**

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

Área de Concentração: Toxicologia.

**Orientadora:** Profa. Dra. Maria de Lourdes  
Pires Bianchi

**Orientado:** Alexandre Ferro Aissa

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

Aissa, Alexandre Ferro

Avaliação da atividade antimutagênica do beta-caroteno microencapsulado em células de ratos tratados com o antitumoral doxorubicina empregando os ensaios de micronúcleo e cometa. Ribeirão Preto, 2010.

103 p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Bianchi, Maria de Lourdes Pires.

1. Genotoxicidade. 2. Mutagenicidade. 3. Fígado. 4. Rim. 5. Corante. 6. Medula Óssea.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Alexandre Ferro Aissa

Avaliação da atividade antimutagênica do beta-caroteno microencapsulado em células de ratos tratados com o antitumoral doxorrubicina empregando os ensaios de micronúcleo e cometa

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

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Maria de Lourdes Pires Bianchi

Orientado: Alexandre Ferro Aissa

Aprovado em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dr. \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

***Dedicatória***

---

## DEDICATÓRIA

*Dedico essa minha conquista às pessoas que me deram suporte para que ela se tornasse possível. À minha família. Cada palavra de apoio me deu forças para alcançar todos os meus objetivos.*

*Dedico aos meus avós Zumira e João Ferro, pelo exemplo de honestidade e de vida. Obrigado por sempre se orgulharem de mim.*

*Dedico ao meu pai, Antonio Aissa, que sempre se preocupou com meus problemas e sempre me apoiou em minhas decisões.*

*Dedico à minha irmã, Camila Ferro Aissa, que sempre teve orgulho de todos os meus passos. Espero sempre contar com sua companhia.*

*E dedico à minha mãe, Maria Elisabeti Ferro Aissa. A pessoa mais incrível que eu conheço. A pessoa que me fez entender o sentido das palavras amor e respeito. Dedico essa conquista a você, mãe, por me tornar a pessoa que sou hoje.*

***Agradecimientos***

---

## AGRADECIMENTOS

*Agradeço...*

*À professora Maria de Lourdes Pires Bianchi, pela oportunidade de realizar este trabalho e por acreditar em mim. Obrigado pelas orientações e pelas palavras de apoio. Obrigado pelo carinho e atenção que sempre fiquei feliz em receber.*

*À professora Lusânia Maria Greggi Antunes pelos infinitos ensinamentos. Pela chance de desenvolver meu projeto em uma área tão interessante. Por toda pronta ajuda. Pelas orientações, conselhos e dicas. Por me ensinar que a ciência e a arte andam juntas. Pelo exemplo de conduta a ser seguido como pesquisadora e professora. Obrigado pelo seu papel além de orientadora, sempre me incentivando e me apoiando nas dificuldades encontradas. Obrigado pela oportunidade de crescimento científico e pessoal. Muito obrigado!*

*À Joana D'arc Castania Darin, pela paciência e todas as orientações dentro do laboratório.*

*À Regislaine Valéria Burin pelos ensinamentos de algumas técnicas utilizadas neste trabalho.*

*Aos amigos da Comissão Organizadora do III SINPOSPq, com quem tive a chance de aprender lições sobre companheirismo, profissionalismo e eficiência.*

*Aos meus melhores amigos Daniel, Eduardo, Guilherme, Evandro, João Victor, Juninho, Matheus, Neto e Gustavo por fazerem parte da minha vida e me proporcionar momentos de grande felicidade. Por me fazerem entender o sentido da palavra amizade. Pelo sincero interesse em minha carreira profissional e pela sincera torcida para o meu sucesso. Obrigado pela família que vocês se tornaram para mim.*

*À minha amada companheira Fernanda Elisa. Com quem vivo os momentos mais felizes da minha vida. Obrigado pela compreensão e pelas palavras e mensagens de apoio e incentivo. Sem você, nada disso valeria à pena, pois a vida não tem sentido se não tivermos amor.*

*Aos meus amigos do Laboratório de Nutrigenômica. Pessoas que foram e sempre serão muito mais do que colegas de trabalho. Pessoas com quem vivi momentos indescritivelmente agradáveis. Pessoas que se tornaram meus amigos e que levarei por toda a minha vida.*

*Agradeço...*

*À Catia Lira do Amaral por todo o ensinamento da técnica do cometa. Por todas as palavras de apoio nos momentos de dificuldade. Por me ensinar que nada é tão difícil quanto parece. Sem sua sabedoria esta pesquisa teria sido muito mais difícil.*

*À Rafaela de Barros e Lima Bueno por toda a ajuda à minha pesquisa e pela sua alegria contagiante, tornando o nosso laboratório um lugar muito mais fácil de trabalhar.*

*À Juliana Carvalho Ribeiro por toda a confiança em mim depositada. Por toda ajuda em minha pesquisa. Pelo inconfundível companheirismo e pelo exemplo de determinação e empreendedorismo.*

*À Graciela Cristina dos Santos pelas pacientes explicações de assuntos por mim ainda incompreendidos, relacionados à área farmacêutica.*

*Ao Leonardo Meneghin Mendonça por suas riquíssimas opiniões e sugestões científicas.*

*À Livia Cristina Hernandes por toda ajuda e determinação relacionadas à minha pesquisa.*

*À Eliziani Mieke Konta pela paciência, ensinamento e incondicional ajuda na realização de todo o meu trabalho.*

*À Juliana Mara Serpeloni, Mara Ribeiro de Almeida, Carla Machado, Patricia Furlan e Estela Beatriz Behling por toda a ajuda, incentivo e apoio. Por todas as conversas e momentos tão agradáveis que tive em suas presenças.*



## RESUMO

**AISSA, A. F. Avaliação da atividade antimutagênica do beta-caroteno microencapsulado em células de ratos tratados com o antitumoral doxorrubicina empregando os ensaios de micronúcleo e cometa.** 2010. 103f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Os corantes são muito usados na indústria alimentícia. Podendo ser de origem natural ou sintética, estes são utilizados na produção de alimentos no intuito de compensar a perda da cor durante a fabricação e estocagem, garantir a uniformidade da cor e também de atribuir coloração àqueles originalmente incolores. Dentre os pigmentos naturais, o beta-caroteno (BC) tem sido um dos mais adicionados em alimentos. Por outro lado, a utilização do BC é limitada devido à sua instabilidade. Por essa razão, técnicas de microencapsulamento são muito utilizadas, pois podem proteger o material microencapsulado de ações oxidantes, prolongando a propriedade do composto. Porém, nestes processos tecnológicos, as propriedades do composto encapsulado devem ser cuidadosamente estudadas. O objetivo deste trabalho foi comparar a possível ação antimutagênica do BC puro e na forma microencapsulada (BCM) por meio do teste do micronúcleo em células da medula óssea e sangue periférico, e por meio do ensaio do cometa em rins e fígado de ratos tratados com o antitumoral doxorrubicina (DXR). Para isso, o tratamento foi feito com duas doses do carotenóide (2,5 ou 5 mg/kg) puro ou microencapsulado, por gavagem durante 14 dias, seguida de injeção intraperitoneal de salina ou do antitumoral DXR (16 mg/kg), logo após a última gavagem. Ratos Wistar machos foram divididos em 14 grupos de tratamentos (n=6/grupo), e foram sacrificados 24h após a injeção intraperitoneal. Os resultados com o teste do micronúcleo nos dois tecidos mostram que o BC não foi mutagênico, exceto na dose de 5mg/kg. No BCM as doses não foram mutagênicas e na associação BCM+DXR apenas a maior dose foi antimutagênica. Os resultados com o teste do cometa nos rins e fígado mostram que o BC não foi genotóxico e quando associado à DXR obteve valores de proteção semelhantes aos resultados obtidos com o controle solvente (óleo de milho). O BCM também não foi genotóxico em qualquer dos tecidos. Quando associado à DXR as duas doses tiveram efeito protetor contra a fragmentação do DNA no fígado. No rim, a dose BCM 2,5mg+DXR foi genotóxica e a dose BCM 5mg+DXR foi antigenotóxica. A antimutagenicidade observada pode ser explicada pela ação antioxidante do beta-caroteno. No entanto, quando uma dose alta é utilizada, os produtos de clivagem do carotenóide podem aumentar a formação de espécies reativas de oxigênio induzindo ainda mais a formação de micronúcleos. A diferença entre os resultados obtidos com as duas doses do BC e do BCM indicam que, talvez, a biodisponibilidade do carotenóide foi alterada pelo processo de microencapsulamento. No entanto, o efeito protetor observado em uma das doses do BCM pode ser explicado pela capacidade antioxidante do beta-caroteno, mesmo na forma microencapsulada. Em conclusão, o BC puro não deve ser utilizado em altas doses, pois aumenta o dano ao DNA e quando microencapsulado não perde suas propriedades, porém uma dose maior deve ser utilizada para que o carotenóide tenha efeito antimutagênico.

Palavras chave: genotoxicidade, mutagenicidade, fígado, rim, corante, medula óssea

## ABSTRACT

AISSA, A.F. **Evaluation of beta-carotene microencapsulated antimutagenic activity in cells of rats treated with antitumor doxorubicin using micronucleus test and comet assay.** 2010. 103f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Colorants are commonly used in the food industry. From natural or synthetic origin, these colorants are used in food production in order to recompense the loss of color during manufacturing and stowage processes, guarantee color uniformity and also attribute color to those colorless ones. Among natural pigments, beta-carotene (BC) has been one of the most added to food. On the other hand, the utilization of BC is limited due to its instability. On that account, microencapsulation techniques are more used, once they can protect the microencapsulated material from oxidizing actions, extending the composition property. Nevertheless, in these technological processes, the properties of the encapsulated compound must be studied carefully. The aim of this work was to compare the possible antimutagenic action of pure and microencapsulated BC (BCM) through micronucleus test in cells of bone marrow and peripheral blood, and through comet assay in kidneys and livers of rats treated with the antitumoral doxorubicin (DXR). For this, the treatment was made of two doses of pure and microencapsulated carotenoid (2.5 or 5 mg/kg), by gavage during 14 days, followed by saline intraperitoneal injection or antitumor DXR (16 mg/kg), right after the last gavage. Male Wistar rats were divided in 14 treatment groups (n=6/group), and were sacrificed 24 hours after the intraperitoneal injection. The micronucleus test results in both tissues show that BC was not mutagenic, except for the 5mg/kg dose. In BCM the doses were not mutagenic and in the association of BCM+DXR, only the higher dose was antimutagenic. The results of the comet assay in kidney and liver show that BC was not genotoxic and when associated to DXR it obtained protection values similar to the results obtained with the solvent control (corn oil). BCM was also not genotoxic in none of the tissues. Once associated to DXR, the two doses had protector effect against the DNA fragmentation in the liver. In the kidney, the BCM 2.5mg+DXR dose was genotoxic and the BCM 5mg+DXR dose was antigenotoxic. The observed antimutagenicity can be explained by the beta-carotene antioxidant action. However, when a higher dose is used, the carotenoid cleavage products can increase the formation of reactive oxygen species inducing the formation of micronucleus. The difference between the results obtained with the two doses, BC and BCM, indicates that, perhaps, the carotenoid biodisponibility was modified by the process of microencapsulation. Nevertheless, the protector effect observed in one of the BCM doses can be explained by the beta-carotene antioxidant capacity, even in the microencapsulated form. In conclusion, the pure BC should not be used in high dose, because it increases damage to DNA and while microencapsulated it does not lose its properties, but one higher dose must be used for the carotenoid to have antimutagenic effect.

**Key-words:** genotoxicity, mutagenicity, kidney, liver, colorant, bone marrow.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Fórmula estrutural do beta-caroteno.....	20
Figura 2 -	Processo de eritropoiese <i>in vivo</i> . Mecanismo de formação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos e micronúcleos .....	30
Figura 3 -	Representação esquemática do protocolo de tratamento .....	40
Figura 4 -	Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos e normocromático de medula óssea de ratos .....	45
Figura 5 -	Fotomicrografia obtida de células de rim de rato tratado com doxorrubicina (16 mg/Kg p.c.) pela análise do cometa em microscópio de fluorescência.....	48
Figura 6 -	Porcentagem do ganho de peso em relação ao peso inicial de ratos Wistar tratados com duas doses (2,5 ou 5 mg/kg p.c.) de beta-caroteno puro (BC) ou microencapsulado (BCM), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.), logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia.....	50
Figura 7 -	Ensaio do Cometa no fígado de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno puro (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	58
Figura 8 -	Ensaio do Cometa no rim de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno puro (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	59
Figura 9 -	Ensaio do Cometa no fígado de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	60
Figura 10 -	Ensaio do Cometa no rim de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	61

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Concentração de beta-caroteno nas microcápsulas .....	36
Tabela 2 -	Composição nutricional da ração comercial Nuvilab utilizada no tratamento dos animais .....	39
Tabela 3 –	Composição nutricional do óleo de milho utilizado como solvente na gavagem do beta-caroteno puro.....	41
Tabela 4 –	Razão, em porcentagem, entre o peso dos rins e fígado e o peso corpóreo de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	51
Tabela 5 –	Razão, em porcentagem, entre o peso dos rins e fígado e o peso corpóreo de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2.5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	51
Tabela 6 -	Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) em células da medula óssea e sangue periférico e porcentagem de eritrócitos policromáticos em relação a eritrócitos totais em células da medula óssea de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	53
Tabela 7 -	Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) em células da medula óssea e sangue periférico e porcentagem de eritrócitos policromáticos em relação a eritrócitos totais em células da medula óssea de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	55
Tabela 8 -	Médias da viabilidade celular, analisada através da técnica de exclusão por azul de tripan do homogenato obtido dos rins e fígado de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	56
Tabela 9 -	Médias da viabilidade celular, analisada através da técnica de exclusão por azul de tripan do homogenato obtido dos rins e fígado de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA .....	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BC .....	Beta-caroteno
BCM .....	Beta-caroteno Microencapsulado
CEUA .....	Comitê de Ética no Uso de Animais
DE .....	Dextrose Equivalente
DNA .....	Ácido Desoxirribonucléico
DXR .....	Doxorrubicina
HPLC-PDA .....	High Performance Liquid Chromatography-Photo diode Array
i.p. ....	Intraperitoneal
MN .....	Micronúcleo
MNPCE .....	Eritrócito Policromático Micronucleado
NCE .....	Eritrócito Normocromático
p.c. ....	peso corpóreo
P.M. ....	Peso Molecular
PCE .....	Eritrócito Policromático
RPM .....	Rotações por minuto
UI .....	Unidade Internacional
USP .....	Universidade de São Paulo
UV .....	Ultravioleta
IDA .....	Ingestão Diária Aceitável

## SUMÁRIO

RESUMO.....	i
ABSTRACT .....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
LISTA DE TABELAS.....	iv
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	v
1. INTRODUÇÃO .....	15
1.1 Os carotenóides .....	16
1.2 Microencapsulamento de Carotenóides por “ <i>Spray-Dryer</i> ” .....	24
1.3 O Antitumoral Doxorrubicina.....	26
1.4 Ensaio de Mutagenicidade .....	28
1.4.1 Teste do Micronúcleo .....	29
1.4.2 Ensaio do Cometa .....	31
2. OBJETIVOS .....	33
2.1 Objetivos Específicos.....	34
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
3.1 Fármacos e Reagentes .....	36
3.2 Microencapsulamento do Beta-Caroteno .....	37
3.2.1 Material .....	37
3.2.2 Preparação das Microcápsulas.....	37
3.2.3 Eficiência do Microencapsulamento.....	37
3.2.4 Distribuição Granulométrica .....	38
3.3 Animais.....	38
3.4 Protocolo Experimental .....	40

<b>3.5</b>	<b>Monitoração do Peso dos Animais .....</b>	<b>43</b>
<b>3.6</b>	<b>Ensaio do Micronúcleo em Medula Óssea.....</b>	<b>43</b>
<b>3.6.1</b>	<b>Análise da Relação entre Eritrócitos Policromáticos/Normocromáticos ....</b>	<b>44</b>
<b>3.7</b>	<b>Técnica do Micronúcleo em Sangue Periférico de Ratos.....</b>	<b>45</b>
<b>3.8</b>	<b>Ensaio do Cometa .....</b>	<b>46</b>
<b>3.8.1</b>	<b>Isolamento e Viabilidade Celular .....</b>	<b>46</b>
<b>3.8.2</b>	<b>Preparo das Lâminas .....</b>	<b>46</b>
<b>3.8.3</b>	<b>Análise das Lâminas do Ensaio do Cometa .....</b>	<b>47</b>
<b>3.9</b>	<b>Forma de Análise dos Resultados .....</b>	<b>48</b>
<b>4.</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
<b>4.1</b>	<b>Monitoração do Peso dos Animais .....</b>	<b>50</b>
<b>4.2</b>	<b>Ensaio do Micronúcleo em Medula Óssea e Sangue periférico.....</b>	<b>52</b>
<b>4.3</b>	<b>Ensaio do Cometa .....</b>	<b>56</b>
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>62</b>
<b>5.1</b>	<b>Monitoração do Peso dos Animais .....</b>	<b>64</b>
<b>5.2</b>	<b>Técnica do Micronúcleo em Medula Óssea.....</b>	<b>65</b>
<b>5.3</b>	<b>Técnica do Micronúcleo em Sangue Periférico de Ratos.....</b>	<b>71</b>
<b>5.4</b>	<b>Ensaio do Cometa .....</b>	<b>73</b>
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>79</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>82</b>
	<b>ANEXO.....</b>	<b>101</b>





## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Os carotenóides

Nas últimas décadas a fabricação e o preparo de alimentos têm se modificado muito, principalmente quanto às suas formas de distribuição e de apresentação ao consumidor. No passado, os alimentos provinham da região onde eram produzidos ou de regiões muito próximas. Atualmente, boa parte dos alimentos é proveniente de regiões longínquas e necessitam, freqüentemente, de aditivos e conservadores para manter a sua integridade (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Aditivos são substâncias adicionadas ao alimento em qualquer estágio de sua produção, processamento, embalagem, transporte ou armazenamento (RANDHAWA; BAHNA, 2009). Historicamente, os aditivos alimentares eram de origem natural, depois os aditivos sintéticos foram gradualmente introduzidos e sua utilização se tornou predominante. Centenas de aditivos, sintéticos ou naturais, são usados atualmente na indústria alimentícia. Porém, o interesse recente em produtos naturais tem levado ao aumento no uso de substâncias provenientes de plantas e animais (RANDHAWA; BAHNA, 2009).

Os pigmentos e corantes são muito usados na indústria alimentícia, com o objetivo de melhorar a apresentação do alimento ao consumidor. Podendo ser de origem natural ou sintética, estes são utilizados na produção de alimentos e bebidas no intuito de compensar a perda da cor durante a fabricação e estocagem, garantir a uniformidade da cor e também de atribuir coloração àqueles originalmente incolores (TOCCHINI; MERCADANTE, 2001).

Devido à crescente busca dos consumidores por produtos naturais, a substituição de corantes sintéticos por naturais tem se tornado muito interessante na indústria alimentícia (MAPARI; MEYER; THRANE, 2009). Os países da União Européia proibiram o uso de alguns corantes sintéticos em alimentos (WANG et al., 2009). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou recentemente a Resolução RDC 41/2009, restringindo o uso de corante e aromas em bebidas alcoólicas (BRASIL, 2009). O uso de

aromatizantes sintéticos e de corantes está proibido em licores, aperitivos e bebidas mistas derivadas da uva e do vinho com graduação alcoólica de até 15%. Além de atribuir cor aos alimentos que os contém, muitos corantes naturais têm propriedades benéficas à saúde humana. Com isso, sua utilização torna-se muito conveniente, pois além de melhorar a aparência dos alimentos, podem ajudar a promover a saúde de quem se alimenta destes produtos (REDDY; ALEXANDER-LINDO; NAIR, 2005). Adicionalmente, as propriedades antioxidantes de corantes naturais podem ainda proteger os alimentos, prevenindo a oxidação de matérias primas alimentares, como óleos, carnes, leite e seus derivados, estendendo a sua vida-de-prateleira (DECKER et al., 2005).

Dados epidemiológicos mostraram a associação entre a ingestão de frutas e vegetais e a diminuição do risco de desenvolvimento de diversas desordens crônico-degenerativas, tais como doenças cardiovasculares, neurodegenerativas, cânceres, diabetes e outras, sendo os pigmentos um dos grupos de compostos bioativos aos quais são atribuídas tais ações (CALABRESE et al., 2008; BALSANO; ALISI, 2009; YNGVE, 2009). Os mecanismos envolvidos ainda não foram totalmente elucidados, mas de maneira geral, a redução do risco dessas doenças envolve a redução ou inibição de reações de oxidação e a inibição do processo de estresse oxidativo celular.

O estresse oxidativo induzido por espécies reativas de oxigênio, como radicais livres e oxigênio singlete pode causar danos ao DNA que, se não forem reparados, resultam em mutações, quebras, ligações cruzadas, e rearranjos do cromossomo e por fim, na indução de câncer. Da mesma forma, danos oxidativos em grandes moléculas de proteínas, lipídios e lipoproteínas têm sido associados ao desenvolvimento de aterosclerose e reações inflamatórias por diversos mecanismos. Entretanto, existem poucos trabalhos na literatura sobre a modulação de corantes, pigmentos e extratos encontrados na dieta sobre a indução de danos cromossômicos e possíveis efeitos antimutagênicos e antioxidantes (ANTUNES;

ARAÚJO, 2000). Estudo feito por Sasaki et al. (2002) analisou a genotoxicidade de 39 aditivos alimentares, entre eles alguns corantes, em oito tecidos de camundongos por meio do ensaio do cometa. Os corantes foram os mais genotóxicos entre todos os aditivos estudados. Os corantes amaranço, vermelho allura, “*New Coccine*”, tartrazina, eritrosina, floxina, e rosa bengala induziram dano ao DNA no estômago, cólon e bexiga dos animais. Todos estes corantes induziram dano ao DNA no trato digestório, mesmo em dosagem baixa (10 ou 100mg/kg). Entre eles, amaranço, vermelho allura, “*New Coccine*” e tartrazina, induziram dano ao DNA no cólon em doses de Ingestão Diária Aceitável (IDA). No entanto, em trabalho publicado por Poul et al. (2009), foi avaliado o potencial genotóxico dos corantes amaranço, amarelo crepúsculo e tartrazina no intestino de camundongos por meio do teste do micronúcleo. Este estudo demonstrou que a exposição oral aguda aos corantes em doses até 2000 mg/kg, não induziu efeitos genotóxicos no intestino dos animais. O autor ainda sugere que a genotoxicidade observada por Sasaki et al. (2002) pode ser parcialmente explicada pela citotoxicidade tecido-específica dos corantes analisados.

Dentre os pigmentos naturais, sem dúvida os carotenóides têm sido os mais adicionados em alimentos, bebidas, cosméticos e rações animais. Podem ser obtidos a um baixo custo, por síntese química, a maioria com estrutura idêntica aos naturais, ou por extração a partir de algumas fontes naturais, tais como urucum e tomate. A bixina é o principal carotenóide presente nas sementes de urucum. Preparações deste composto são muito utilizadas na indústria para dar cor a alimentos como salsicha, margarina, salgadinhos e queijo (RIOS; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005).

De acordo com a Resolução - CNNPA nº 44, de 1978, publicado pela ANVISA, “corante orgânico sintético idêntico ao natural - é o corante orgânico sintético cuja estrutura química é semelhante à do princípio ativo isolado de corante orgânico natural” (ANVISA, 1978). O beta-caroteno sintético, neste sentido, apesar de não ser uma substância de origem

natural, torna-se interessante na indústria de alimentos, pois mantém suas propriedades benéficas devido à sua estrutura química idêntica àquele obtido naturalmente e ainda torna sua produção viável.

Os carotenóides são uma família de pigmentos sintetizados apenas por plantas e microorganismos. Nas plantas, desempenham função no mecanismo fotossintético e na proteção contra o dano causado por exposição à luz. Frutas e vegetais constituem a maior fonte de carotenóides na dieta humana, presentes como microcomponentes e responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha destes alimentos (MANGELS et al., 1993). Acredita-se que os carotenóides são os responsáveis pelas propriedades benéficas de frutas e vegetais na prevenção de doenças como câncer, doenças cardiovasculares e doenças crônicas (ASTORG et al., 1997; PAIVA; RUSSELL, 1999). Mais de 600 carotenóides têm sido identificados na natureza. No entanto, aproximadamente 40 estão presentes na dieta humana. Destes 40, apenas 20 carotenóides têm sido avaliados em tecidos humanos. E 90% dos carotenóides presentes na dieta e tecidos humanos são representados pelo alfa-caroteno, beta-caroteno, licopeno, luteína e criptoxantina (RAO; RAO, 2007).

Desde o estudo de Peto, Doll e Sporn (1981), mostrando a relação inversa entre o risco de câncer e o consumo de produtos ricos em carotenóides, as pesquisas com beta-caroteno vêm se intensificando. Encontrado principalmente em frutas e vegetais de coloração amarela e verde como cenoura, espinafre, damasco, batata doce, brócolis, pimentas e pêssego (RAO; RAO, 2007; KEIJER et al., 2005), o beta-caroteno tem importante papel na manutenção da saúde, agindo como potente antioxidante e como matéria-prima para produção metabólica de retinol e vitamina A.

Estudos feitos por Foote e Denny (1968), evidenciaram o beta-caroteno como eficiente seqüestrador de oxigênio singlete. O potencial antioxidante do beta-caroteno, bem reconhecido entre outros pigmentos encontrados em vegetais, se deve ao número de ligações duplas

conjugadas presentes na molécula, proporcionando a este composto alta reatividade química (Figura 1).

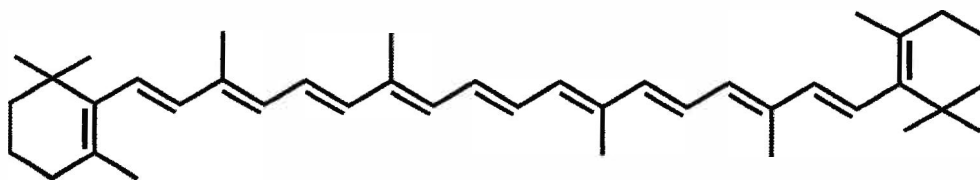
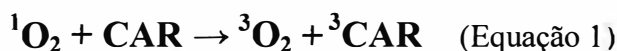


Figura 1 - Fórmula estrutural do beta-caroteno. Fonte: IUPAC, 1975.

Os carotenóides têm propriedades antioxidantes devido à sua alta capacidade de seqüestrar radicais livres e desativar espécies reativas de oxigênio (EDGE; MCGARVEY; TRUSCOTT, 1997). A desativação do oxigênio singlete ocorre através de processo físico ou químico de transferência de energia (STRATTON; SCHAEFER; LIEBLER, 1993).

A supressão do oxigênio singlete pelo processo físico ocorre através da transferência da energia de excitação do  $^1\text{O}_2$  para o carotenóide, resultando em um estado estável do oxigênio e um estado triplete do carotenóide. A energia do carotenóide, então é dissipada entre o meio, através de interações rotacionais e vibracionais, retornando para sua forma estável (Equações 1 e 2). Neste sistema o carotenóide permanece intacto e pode, novamente, inativar outro oxigênio (STAHL; SIES, 1993).



Por outro lado, o processo de desativação química resulta em destruição do cromóforo e na formação de produtos de oxidação (Equação 3) (STRATTON; SCHAEFER; LIEBLER, 1993) com a possibilidade de reações de adição (LIEBLER, 1993; YAMAUCHI et al., 1993).



Após uma completa avaliação da literatura relacionada a carotenóides e câncer, a “*Internacional Agency for Research on Câncer*” (IARC, 1998), concluiu que havia evidências suficientes sobre a eficiência da atividade câncer-preventiva do beta-caroteno em modelos animais experimentais. Esta proteção se deve principalmente à sua característica antioxidante e pró-vitamina A. Além das funções já conhecidas da vitamina A, esta substância também vem sendo objeto de pesquisa em relação a sua ação anti-carcinogênica, devido às suas funções de controle de diferenciação e proliferação celular (ARAB; STECK-SCOTT; BOWEN, 2001).

Algumas pesquisas, no entanto, já mostraram efeito pró-oxidante deste carotenóide. O beta-caroteno, na concentração de 10  $\mu\text{M}$  aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio e as concentrações de glutatona em células humanas leucêmicas e de adenocarcinoma do colón, *in vitro* (PALOZZA et al., 2003). O efeito pró-oxidante do beta-caroteno também foi demonstrado em ratos, que apresentaram aumento da atividade de enzimas de fase I do fígado, como também aumento do estresse oxidativo (PAOLINI et al., 2001).

Vários estudos vêm sendo realizados para analisar a dose diária ideal de beta-caroteno que pode ser administrada para o ser humano. O aumento do interesse nestes estudos é justificado principalmente, pelos resultados de duas grandes pesquisas envolvendo fumantes e trabalhadores de fábricas de asbestos. A primeira delas (*alpha-tocopherol/beta-carotene - ATBC*) foi desenvolvida pelo U.S. *National Cancer Institute*, na Finlândia. Nesta pesquisa uma dose suplementar de 20mg/dia de beta-caroteno foi administrada em 29.133 homens, fumantes, com idade entre 50 e 69 anos, durante 5 a 8 anos. Esta dose, consideravelmente maior do que a quantidade normal ingerida pela população finlandesa, provocou um aumento de 18% na incidência de câncer de pulmão, aumentando em 8% a mortalidade por este tipo de doença (ATBC, 1994). Outro estudo foi intitulado *Carotene and Retinol Efficacy Trial (CARET)*,

realizado nos Estados Unidos. Nesta pesquisa foram administrados 30mg/dia de beta-caroteno e 25.000 UI/dia de retinil ester em pessoas fumantes e trabalhadoras de fábricas de asbestos. Foram envolvidas 18.314 pessoas no tratamento que levou 4 anos. Após este período, observou-se um aumento de 28% na incidência de câncer de pulmão e aumento de 17% na mortalidade em comparação ao grupo placebo (OMENN et al., 1996).

Por outro lado, um estudo intitulado “*The Physicians’ Health Study*” feito por Hennekens et al. (1996) com a aplicação de uma dose ainda maior de beta-caroteno (50mg), durante 1982 e 1995, em dias alternados, não mostrou aumento na incidência de câncer entre os pacientes que eram, na maioria, não-fumantes. Adicionalmente, em 1997 foi iniciado o “*The Physicians’ Health Study II*” dando continuidade ao tratamento com beta caroteno dos participantes do primeiro estudo e ainda o recrutamento de mais voluntários. Neste segundo estudo puderam concluir que o tratamento a longo prazo com beta caroteno promoveu benefícios à cognição dos voluntários que fizeram parte do primeiro e do segundo estudo (GRODSTEIN et al., 2007).

Pesquisa conduzida por Zhang e Omaye (2001), mostrou que a atividade antioxidante ou pró-oxidante do beta-caroteno provavelmente está relacionada com sua concentração e a pressão de oxigênio no meio, o que explicaria o aumento na incidência de câncer de pulmão em pessoas fumantes, quando é feita a suplementação com o carotenóide.

Em estudo recente, o beta-caroteno e demais carotenóides, bem como o alfa-tocoferol, selênio e radicais peroxil, foram dosados no plasma de pacientes com diagnóstico de câncer de pulmão. Os casos positivos (258) apresentaram em média um déficit de 17,1% de beta-caroteno no plasma em relação ao grupo controle (515). Esta diferença, considerada significativa pelos autores, corrobora a importância do beta-caroteno na proteção contra o câncer de pulmão (COMSTOCK et al., 2008). Persson et al. (2008) conduziram uma pesquisa semelhante. Os níveis plasmáticos de beta-caroteno, luteína/zeaxantina, licopeno, retinol, e tocoferol foram

avaliados em pacientes com câncer gástrico. Quando comparado ao controle, apenas o beta-caroteno apresentou relação inversa entre sua concentração no plasma e o risco com este tipo de câncer.

Portanto, mais estudos devem ser feitos para analisar a dose efetiva e segura deste importante nutriente, para que haja a promoção da saúde daqueles que se alimentam de produtos que contenham o beta-caroteno como principal corante. Pesquisa realizada por Liu et al. (2000) analisou a diferença entre a suplementação de beta-caroteno em doses fisiológica (0,43 mg/kg/dia) e farmacológica (2,4 mg/kg/dia). O autor ainda considerou estas doses equivalentes a 6 mg e 30 mg/dia em comparação a uma suplementação em humanos. Durante o período de tratamento de 6 meses, os animais ainda foram expostos a fumaça de cigarro. Foram investigados neste estudo os efeitos destas doses quanto à concentração de beta-caroteno e ácido retinóico, expressão de receptores de ácido retinóico, fatores de transcrição (AP-1; c-Jun e c-Fos), ciclina D1, antígeno nuclear de proliferação celular, e mudanças histopatológicas, todos os parâmetros analisados no pulmão dos animais. O autor concluiu que a dose fisiológica não demonstrou efeitos prejudiciais e ainda ofereceu proteção contra danos induzidos pela fumaça de cigarro no pulmão dos animais.

A dose adequada destes corantes em uma dieta regular, portanto pode promover a saúde e qualidade de vida. Porém, a questão que ainda permanece sem resposta é como estes corantes, na dose adequada, podem fornecer o benefício esperado *in vivo* quando consumidos (REDDY; ALEXANDER-LINDO; NAIR, 2005).

Embora não existam trabalhos recentes envolvendo a análise do potencial antimutagênico do beta-caroteno puro, existem estudos que comprovam essa propriedade do carotenóide, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Gleit et al. (2002), pesquisando o efeito protetor do beta-caroteno e licopeno contra danos genotóxicos induzidos pelo antitumoral bleomicina em linfócitos em cultura, concluíram que o beta-caroteno foi capaz de proteger o DNA das células



contra quebras induzidas por este antitumoral, enquanto que o licopeno não teve o mesmo efeito. Belogolovskaya et al. (2000) observaram que a frequência de aberrações cromossômicas, produzidas pela ciclofosfamida, em medula óssea de camundongos, foi reduzida após tratamento com associação de aspartame (0,4 e 4mg/kg) e beta-caroteno (0,15-15mg/kg). Outro estudo foi conduzido por Patel et al. (1998) para tentar avaliar o efeito protetor do beta-caroteno contra a clastogenicidade de “*pan masala*”, uma mistura feita com tabaco e nozes, usada em algumas culturas para mastigação. O uso dessa substância está relacionado com câncer bucal. Foi observado, neste estudo, o potencial anticlastogênico do beta-caroteno na redução da frequência de aberrações cromossômicas e trocas de cromátides irmãs, em células em cultura de ovário de camundongos.

O potencial tecnológico atual da indústria alimentícia tem permitido o desenvolvimento de nutrientes encapsulados que podem aumentar a qualidade nutricional dos alimentos e aprimorar a forma de liberação de compostos bioativos *in vivo*, melhorando a qualidade de vida dos consumidores (AUGUSTIN; HEMAR, 2009). Avanços são feitos no entendimento de como os efeitos fisiológicos de ingredientes alimentares são afetados pelo processamento industrial e como estes alimentos são digeridos e metabolizados (DE VOS et al., 2006). No entanto, ainda não se tem conhecimento de como as tecnologias utilizadas para melhorar o potencial antioxidante de alimentos poderia ou não contribuir para a promoção da saúde dos consumidores. Com isso, é necessário que se façam estudos das propriedades destes compostos em sistemas biológicos.

## **1.2 Microencapsulamento de Carotenóides por “*Spray-Dryer*”**

A tecnologia de microencapsulamento consiste de um empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquido ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas, que liberam o conteúdo

encapsulado em taxas constantes durante prolongado período de tempo (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). As microcápsulas são muito utilizadas na indústria alimentícia e farmacêutica. O uso do microencapsulamento na indústria alimentícia, para proteger, isolar ou controlar a liberação de uma substância, é de grande interesse (SCHROOYEN; VAN DER MEER; DE KRUIF, 2001). Com a técnica é possível a obtenção de compostos na forma de pó estável, dispersível em água e de fácil incorporação aos alimentos.

Dentre as várias técnicas de encapsulamento disponíveis, “*spray-drying*” é uma das mais utilizadas na indústria de alimentos, cosméticos e medicamentos. Wagner e Warthesen (1995) obtiveram maior eficiência no encapsulamento tanto para o alfa- (89%) como para o beta-caroteno (87%) quando foi utilizada maltodextrina 4 como material de parede. Oleoresina de rosa mosqueta contendo elevado teor de carotenóides foi encapsulada por “*spray-dryer*” com temperatura de entrada do ar de  $150 \pm 5^\circ\text{C}$  ou  $100 \pm 5^\circ\text{C}$  e temperatura de saída do ar de  $70 \pm 5^\circ\text{C}$  ou  $65 \pm 5^\circ\text{C}$ , com amido ou gelatina como encapsulantes, respectivamente. A perda de *trans*-rubixantina durante o processo de encapsulamento, tanto com matriz de amido quanto de gelatina, foi de 40%. As perdas de *trans*-licopeno e de *trans*-beta-caroteno em gelatina foram de 28 e 1%, respectivamente, enquanto em matriz de amido foram maiores, de 46 e 29% (ROBERT et al., 2003).

Padrão cristalizado de *trans*-beta-caroteno foi encapsulado por Desobry, Netto e Labuza (1997) com 40% de maltodextrina em “*spray-dryer*”, operado com temperaturas de entrada e saída de ar de  $170 \pm 5^\circ\text{C}$  e  $95 \pm 5^\circ\text{C}$ , respectivamente. A perda de beta-caroteno durante o processo foi de 11% e a eficiência do encapsulamento foi de  $62 \pm 2\%$ . Em outro estudo, Desobry, Netto e Labuza (1999), utilizando as mesmas condições para o “*spray-dryer*”, compararam o uso da maltodextrina 25 DE com as maltodextrinas 15 DE e 4 DE adicionadas de glicose (9 ou 18%), galactose (9 ou 18%) ou lactose (24 ou 40%) para encapsular beta-caroteno, sendo obtida eficiência de 78% no encapsulamento com a mistura

maltodextrina 4 DE e glicose. Cristais de bixina foram encapsulados com diferentes soluções de polissacarídeos (40% de sólidos) em “*spray-dryer*”, sendo que o encapsulamento atingiu eficiência de 86% e apresentou maior solubilidade em água (BARBOSA; BORSARELLI; MERCADANTE, 2005).

Recentemente, Calvo e Santa-María (2008) comprovaram que a concentração de licopeno e beta-caroteno de sementes e talos de tomates diminuiu em função do tempo de estocagem, quando armazenados sob luz. Por outro lado, Montenegro et al. (2007) relataram que a adição de licopeno encapsulado por “*spray-dryer*” com goma arábica/sacarose (8:2) foi capaz de reduzir em cerca de 45% a velocidade de degradação das vitaminas A e D do leite estocado sob luz fluorescente. Estes estudos mostram como as técnicas de microencapsulamento poderiam proteger a degradação de nutrientes presentes em alimentos.

No entanto, não há dados na literatura sobre os efeitos de carotenóides microencapsulados sobre as macromoléculas celulares.

### 1.3 O Antitumoral Doxorrubicina

Para a avaliação do potencial antimutagênico de um composto, é necessária a utilização de um fármaco capaz de induzir danos ao DNA. A doxorrubicina, portanto, é muito utilizada em estudos para a avaliação de genotoxicidade (ANTUNES; TAKAHASHI, 1998; RIBEIRO et al., 2010; FURTADO et al., 2009; SNYDER, 2009; BARCELOS et al., 2009).

A doxorrubicina é um antitumoral da família das antraciclina, produzida por *Streptomyces peucetius*. Desde sua descoberta na década de 1960 até hoje, as antraciclina são as drogas mais utilizadas no tratamento de vários tipos de câncer como de ovário, mama, bexiga, tireóide e câncer gástrico. O sucesso no uso da doxorrubicina, entretanto, tem sido limitado devido à sua cardiotoxicidade, cuja manifestação está relacionada com a dose total utilizada do antitumoral (CHRISTIANSEN; AUTSCHBACH, 2006). O mecanismo de ação

das antraciclina em células tumorais continua sendo motivo de controvérsia. Alguns mecanismos propostos são a intercalação ao DNA, levando à inibição da transcrição; geração de espécies reativas de oxigênio, provocando dano ao DNA ou peroxidação lipídica; formação de ligações cruzadas na cadeia do DNA; interferência com a abertura e separação das cadeias do DNA através de ação sobre a helicase; efeitos diretos na membrana celular; dano ao DNA e indução de apoptose através da inibição da topoisomerase II (TAKEMURA; FUJIWARA, 2007). Contudo, a atividade sobre a enzima topoisomerase II ainda é considerada como a principal ação antitumoral da doxorrubicina (LIU, 1989; INJAC; STRUKELJ, 2008). Estudo conduzido por Tewey et al. (1984), demonstrou que a inibição da topoisomerase II pela doxorrubicina, pode ser resultante da estabilização do complexo de clivagem e por meio da intercalação ao DNA. A intercalação poderia bloquear o sítio de ligação da topoisomerase II ao DNA comprometendo sua função, haja vista que em altas concentrações de drogas intercalantes, a clivagem do DNA foi inibida. Portanto a doxorrubicina funciona como “veneno” para esta enzima, interrompendo sua função normal e induzindo danos ao DNA (INJAC; STRUKELJ, 2008).

Embora haja conhecimento que as espécies reativas de oxigênio não sejam a principal via de ação antitumoral da doxorrubicina (TEWEY et al., 1984), a formação destas substâncias também afeta a estabilidade do DNA. Os radicais livres produzidos pela doxorrubicina provêm de um sistema não-enzimático que envolve reações com o ferro. O  $\text{Fe}^{3+}$  reage com a doxorrubicina em uma reação redox, que recebe um elétron e um complexo radical  $\text{Fe}^{2+}$ -doxorrubicina é produzido (DE BEER; BOTTONE; VOEST, 2001). Este complexo ferro-doxorrubicina pode reduzir oxigênio a peróxido de hidrogênio e formar outras espécies reativas de oxigênio (GIANNI et al., 1985). Quando estes radicais são formados, podem se ligar ao DNA e provocar quebras das fitas (ELIOT; GIANNI; MYERS, 1984).

Devido à grande importância da doxorubicina na terapia do câncer, pesquisas têm sido direcionadas ao desenvolvimento de mecanismos para prevenir ou atenuar os efeitos citotóxicos do antitumoral. A produção de espécies reativas de oxigênio, como produtos do metabolismo da doxorubicina, é considerado o principal efeito tóxico do medicamento, o que intensifica a busca por substâncias antioxidantes como os carotenóides, flavonóides, polifenóis, selênio e as vitaminas E, C e A (QUILES et al., 2002).

O potencial protetor de compostos sobre os danos induzidos pela doxorubicina, portanto, podem ser avaliados por meio de ensaios de mutagenicidade.

#### **1.4 Ensaios de Mutagenicidade**

Para se conhecer o potencial mutagênico e antimutagênico de um determinado composto, existem testes de mutagenicidade bem definidos e internacionalmente reconhecidos pelas agências regulatórias como parte da bateria de testes recomendada para o registro de novos produtos que entram no mercado mundial. A nova edição do “*Guidelines for Carcinogen Risk Assessment*”, publicada pela Agência de Proteção Ambiental dos Estados Unidos, aponta as alterações na expressão gênica, reparo do DNA, controle do ciclo celular, instabilidade genômica e danos cromossômicos como as principais conseqüências da exposição aos agentes ambientais e eventos críticos envolvidos no processo de carcinogênese (PRESTON, 2007). Esta preocupação com a identificação de fatores envolvidos na etiologia do câncer também inclui o papel da dieta e dos compostos bioativos dos alimentos, tais como os carotenóides. Dentre as metodologias, merecem destaque o teste do micronúcleo e o ensaio do cometa *in vivo*.

### 1.4.1 Teste do Micronúcleo

A maioria das investigações toxicológicas envolvendo carotenóides e o beta-caroteno, tem sido direcionadas para as propriedades antimutagênicas destes compostos (ALIJA et al., 2004). Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos que resultam de quebras ou cromossomos inteiros que se atrasam durante a anáfase, e podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a divisão nuclear. O índice de micronúcleos em células humanas ou de roedores tem se tornado um dos parâmetros citogenéticos empregados na rotina dos testes de genética toxicológica dos agentes químicos e radiações *in vivo* e *in vitro*. Os micronúcleos podem ser analisados em eritrócitos, células da mucosa oral ou linfócitos para a estimativa do dano genético induzido *in vivo* (HAYASHI; SOFUNI; ISHIDATE, 1983).

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos), e de agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal) (HAYASHI; SOFUNI; MORITA, 1991; HAYASHI et al., 2007; TWEATS et al., 2007). Por este parâmetro pode-se avaliar a capacidade de substâncias para induzir dano cromossômico estrutural e/ou numérico em células em divisão na medula óssea.

Na medula óssea, durante o processo de divisão celular, os eritroblastos sofrem duplicação final dos cromossomos diferenciando-se em eritrócitos policromáticos (Figura 2). Estes são eritrócitos jovens, ricos em ribossomos e, por isso, são facilmente corados, diferenciando-se dos eritrócitos maduros ou normocromáticos que não contêm ribossomos. Na presença de agentes clastogênicos e de agentes aneugênicos, os fragmentos cromossômicos resultantes de quebras do material genético podem não ser incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose, originando o micronúcleo. Este, por sua vez, permanece no citoplasma e pode ser facilmente visualizado em eritrócitos policromáticos.

Considerando-se que o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, qualquer micronúcleo que ele contenha tem grande probabilidade de ter sido gerado como aberrações cromossômicas induzidas recentemente, na presença da substância que causou este dano (SCHMID, 1976).

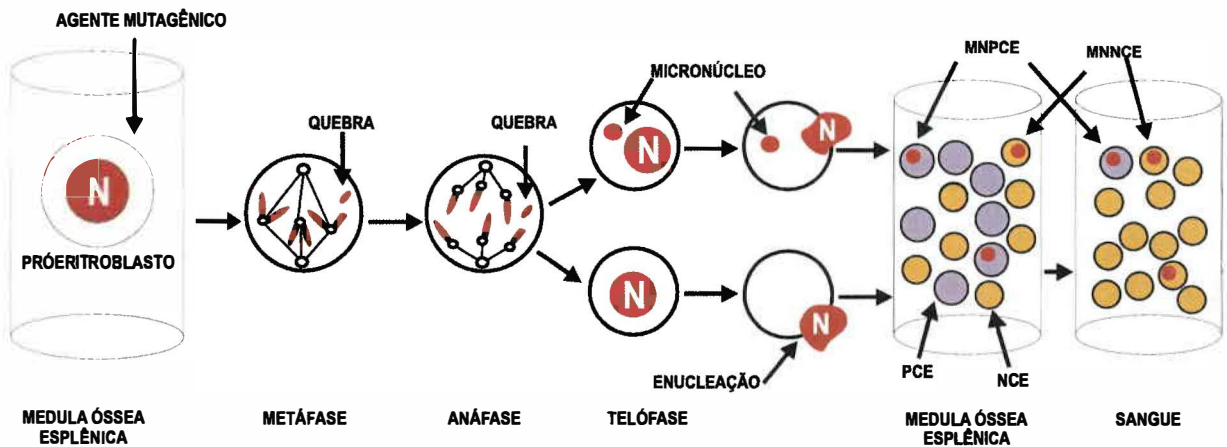


Figura 2 - Processo de eritropoiese *in vivo*. Mecanismo de formação de eritrócitos policromáticos, normocromáticos e micronúcleos. N: núcleo. PCE: eritrócito policromático. NCE: eritrócito normocromático. MNPCE: eritrócito policromático micronucleado. Fonte: Adaptado de Krishna e Hayashi (2000).

Considerando-se que reticulócitos são células eritrocitárias imaturas, o teste do micronúcleo também é realizado em reticulócitos de sangue periférico de roedores tratados com agentes mutagênicos. Simultaneamente, realiza-se a técnica convencional do micronúcleo com células da medula óssea para a comparação dos resultados. Estudos já demonstraram a presença de micronúcleos em sangue periférico, confirmando que os reticulócitos presentes neste tecido também podem ser utilizados como células-alvo para o teste do micronúcleo com resultados confiáveis em roedores (HAYASHI; SOFUNI; MORITA, 1991; HAYASHI et al., 2007).

### 1.4.2 Ensaio do Cometa

Denominado de eletroforese de célula única (“*Single cell electrophoresis test*”) ou ensaio do cometa, esta metodologia foi descrita por Singh et al. (1988) e modificada por Speit e Hartman (1999). No protocolo descrito por Speit e Hartman (1999), para a realização deste ensaio, retira-se células sanguíneas de um animal tratado com a substância em análise e este sangue é misturado com agarose de baixo ponto de fusão. Quando a agarose é solidificada, as células sofrem lise em uma solução detergente por pelo menos uma hora, e então as lâminas são colocadas em câmara de eletroforese com solução alcalina, permitindo o desenrolar do DNA. Quando o composto em análise provoca alguma modificação no material genético, este procedimento resulta na migração de pequenos fragmentos do DNA através do gel de agarose, após a eletroforese. Assim, caracteriza-se a imagem de nucleóides como cometas, com cabeça e cauda, que quando corados podem ser observados em microscópio de fluorescência.

Um dos métodos propostos para avaliação de danos é através da imagem obtida por fotomicrografia e posterior análise por *software* específico. Outro método válido para avaliação é o escore visual, no qual os danos ao DNA são classificados em quatro categorias, distribuídos desde a classe zero, na qual as células não apresentam cauda (dano mínimo), até a classe três, na qual as células apresentam o tamanho da cauda superior a duas vezes o tamanho da cabeça (dano máximo) (TICE et al., 2000).

O ensaio do cometa é um ensaio de genética toxicológica usado para se avaliar a genotoxicidade de um composto. É ainda descrito como um teste rápido, simples na execução, não requer grande quantidade de amostra da substância teste, pode ser aplicado em diferentes tecidos dos quais se obtêm suspensões de determinadas células, é acessível financeiramente além de ser considerado um ensaio de alta sensibilidade e especificidade. O ensaio do cometa permite a detecção de lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutações. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de



correção (ROJAS; LOPEZ; VALVERDE, 1997). Este ensaio foi empregado para a investigação do potencial antioxidante e antígenotóxico das vitaminas E, C, A e seus análogos no fígado de roedores nos quais foi induzida a hepatocarcinogênese pelo agente químico dimetilaminoazobenzeno (VELANGANNI et al., 2007).

Portanto, a dieta e os hábitos alimentares podem aumentar o risco do câncer, devido ao consumo de compostos mutagênicos encontrados nos alimentos. Estes alimentos podem aumentar a quantidade de espécies reativas de oxigênio no organismo. Estas substâncias podem agir no núcleo da célula provocando mutações, alterando o funcionamento normal da célula, proporcionando o desenvolvimento do câncer. Por outro lado, existe um grande número de compostos bioativos nos alimentos identificados como antimutagênicos (FENECH, 2005). Estudos em animais têm mostrado o potencial antimutagênico dos carotenóides da dieta e sua capacidade de sequestrar os radicais livres. Existem poucos trabalhos na literatura sobre a modulação dos pigmentos e extratos encontrados na dieta sobre a indução de danos cromossômicos e possíveis efeitos antimutagênicos e antioxidantes (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). A dieta contém, portanto, compostos bioativos que devem ser testados e estes ensaios biológicos poderão ser realizados tanto com os pigmentos que já são conhecidos, como com aqueles identificados em vegetais ou sintetizados, antes do amplo uso destes pigmentos e extratos nas indústrias de alimentos, farmacêutica e de cosméticos.



## 2. OBJETIVOS

Comparar a possível ação mutagênica/antimutagênica do beta-caroteno puro ou na forma microencapsulada em células da medula óssea, rins, fígado e reticulócitos de ratos Wistar tratados com o antitumoral doxorrubicina.

### 2.1 Objetivos Específicos:

- Avaliar a atividade mutagênica do beta-caroteno puro ou microencapsulado, em tratamento subagudo, em ratos Wistar pela técnica do micronúcleo em células da medula óssea, sangue periférico e ensaio do cometa no rim e fígado;
- Comparar a possível atividade antimutagênica entre beta-caroteno puro e o microencapsulado, em tratamento subagudo em ratos Wistar tratados com o antitumoral doxorrubicina, pela técnica do micronúcleo em células da medula óssea, sangue periférico e ensaio do cometa no rim e fígado;



### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Fármacos e Reagentes

Foi adquirido o beta-caroteno 95% (UV) da Sigma-Aldrich (Missouri, USA), código C9750 – 5g. Os reagentes para o teste do micronúcleo e ensaio do cometa foram adquiridos da SIGMA. As agaroses de baixo ponto de fusão e ponto de fusão normal foram adquiridas da Invitrogen. O antitumoral utilizado foi o Cloridrato de Doxorrubicina – RUBIDOX<sup>®</sup> 50mg, adquirido do laboratório Bergamo. Todos os reagentes utilizados foram de grau analítico.

Através da técnica de “*spray-dryer*”, foram preparados dois tipos de microcápsulas com o beta-caroteno, os quais representam dois níveis de concentração de beta-caroteno que foram estudadas nesta pesquisa. O microencapsulamento foi feito com goma arábica, de forma que foi possível pesar massas semelhantes de pó no preparo da gavagem (Tabela 1) para as duas doses do beta-caroteno (2,5mg e 5mg/kg peso corpóreo – p.c.). Além disso, no preparo dos dois tipos de microcápsulas, foi utilizado o mesmo volume de solvente (diclorometano) para dissolver o beta-caroteno que foi adicionado à solução de goma arábica. No preparo do branco (microcápsulas de goma arábica sem beta-caroteno) também foi adicionado o mesmo volume de solvente (diclorometano). Assim, o branco é o mesmo para os dois tipos de microcápsulas com beta-caroteno. As microcápsulas foram preparadas no laboratório da Profa. Dra. Adriana Zerlotti Mercadante da Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Ciências de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

Tabela 1 - Concentração de beta-caroteno nas microcápsulas

Microcápsulas	Concentração de beta-caroteno nas microcápsulas (mg/g)	Massa de microcápsulas para gavagem (mg/mL)*
Beta-caroteno microencapsulado 2,5mg/kg	5,34 ± 0,75	234
Beta-caroteno microencapsulado 5mg/kg	11,20 ± 0,18	223
Microcápsulas sem beta-caroteno (branco)	-	228,5

Volume de gavagem por kg de peso corpóreo = 2mL

## 3.2 Microencapsulamento do Beta-Caroteno

### 3.2.1 Material

O beta-caroteno foi recristalizado até 98% de pureza, monitorada por HPLC-PDA, antes do uso. Goma arábica em pó (GA, P.M. =  $3,5 \times 10^5$  g/mol) foi fornecida pela Colloids Naturels Brasil (São Paulo, Brazil).

### 3.2.2 Preparação das Microcápsulas

Microcápsulas com duas diferentes concentrações de beta-caroteno ( $5,34 \pm 0,75$  e  $11,20 \pm 0,18$ mg/g) foram preparadas utilizando o sistema "*Spray dryer*" Lab Plant SD-04 (Huddersfield, U.K.) com as seguintes condições de trabalho: diâmetro do pulverizador de 0,7mm, pressão do ar de 5kgf/cm<sup>2</sup>, vazão de ar de 30mL/min, temperatura de entrada e saída do ar de 170 e 110°C, respectivamente. Soluções de goma arábica (200 mL de solução a 30% (p/v) de sólidos solúveis) foram preparadas em água destilada a 45°C e mantidas sob agitação contínua até a temperatura de 30°C. Cristais de beta-caroteno (0,75 e 1,5g) foram dissolvidos em diclorometano, adicionados à solução de polissacarídeo e mantidos sob vigorosa agitação mecânica (7000 rpm) por 30 min, a fim de se obter uma emulsão. Depois disso, água ultra-pura foi adicionada para obter 300 mL de solução do biopolímero a 20% (p/v). A emulsão foi colocada na câmara de "*spray-drier*" mantendo-se a agitação lenta durante o processo de secagem por aspersão. As microcápsulas obtidas foram imediatamente armazenadas em frasco de vidro sob atmosfera de N<sub>2</sub> em temperatura de freezer (-36 °C) para evitar a degradação do beta-caroteno.

### 3.2.3 Eficiência do Microencapsulamento

A eficiência do microencapsulamento foi determinada de acordo com Nunes e Mercadante (2007). Resumidamente, para extração total dos carotenóides com diclorometano,

as microcápsulas foram previamente dissolvidas em solução metanol/água (2:3). Os carotenóides localizados na superfície das microcápsulas foram diretamente extraídos com diclorometano a partir das microcápsulas em pó. Nas duas análises, as fases orgânicas foram recuperadas com funil de separação e secas com Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> anidro. Posteriormente, o solvente orgânico foi removido sob vácuo em evaporador rotativo (T<35°C), e os carotenóides foram re-dissolvidos em éter de petróleo para a quantificação por espectroscopia de absorção UV-visível, utilizando espectrofotômetro *diodo-array* Agilent 8453 (Santa Clara, USA). As concentrações do carotenóide foram calculadas de acordo com seus valores de absorvidade ( $E_{1\text{cm}}^{1\%}$ ) no comprimento de onda máximo como relatado por Davies (1976).

### 3.2.4 Distribuição Granulométrica

A distribuição granulométrica das microcápsulas foi obtida por Espalhamento de Luz Dinâmico (ELD) sendo as medições feitas com o uso do equipamento Malvern-Mastersizer S-MAM-5005 (Worcestershire, UK), realizada no Laboratório de Recursos Analíticos e Calibração (LRAC) da Faculdade de Engenharia Química - UNICAMP. As microcápsulas (5 mg/mL) foram suspensas em álcool isopropílico, uma vez que neste solvente elas não são dissolvidas. Os dados foram coletados por uma série de cinco medidas das suspensões de microcápsulas em duplicata.

Os resultados do tamanho médio das partículas de beta-caroteno foram  $16,77 \pm 0,53$   $\mu\text{m}$  para a dose de 2,5mg e  $18,01 \pm 0,25$   $\mu\text{m}$  para a dose de 5mg de beta-caroteno.

### 3.3 Animais

A ação antimutagênica foi avaliada em células da medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*) Wistar machos, provenientes do Biotério Central da Coordenadoria do Campus

de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (USP). O peso dos animais no início do tratamento foi de  $\pm 100$ g e 4-5 semanas de idade, aproximadamente. Os animais foram mantidos segundo os critérios para o cuidado e uso de animais de laboratório (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals*, 1996). O projeto de pesquisa também foi submetido à apreciação e aprovação (protocolo nº 09.1.503.53.3) da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (em anexo).

Durante os experimentos, os animais foram mantidos no biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – USP em caixas de polietileno com tampa-grade, no máximo de três animais por caixa, sob condições controladas de temperatura e ciclo alternado de luz/escuro de 12 h. Os animais receberam ração padrão para roedores Nuvital<sup>®</sup> da empresa Nuvilab e água *ad libitum*. A composição nutricional da ração comercial utilizada no tratamento dos animais está representada na Tabela 2.

Tabela 2 - Composição nutricional da ração comercial Nuvilab utilizada no tratamento dos animais

<b>Ingrediente</b>	<b>Por 1000 g</b>	<b>Ingrediente</b>	<b>Por 1000 g</b>
<b>Vitaminas</b>		<b>Minerais</b>	
A	25.200 UI	Ferro	50,00 mg
D <sub>3</sub>	2.100 UI	Zinco	60,00 mg
E	60,00 mg	Cobre	10,00 mg
K <sub>3</sub>	12,50 mg	Iodo	2,00 mg
B <sub>1</sub>	14,40 mg	Manganês	60,00 mg
B <sub>2</sub>	11,00 mg	Selênio	0,05 mg
B <sub>6</sub>	12,00 mg	Cobalto	1,50 mg
B <sub>12</sub>	60,00 µg		
Niacina	60,00 mg	<b>Aminoácidos</b>	
Ácido pantotênico	112,00 mg	Lisina	100,00 mg
Ácido fólico	6,00 mg	Metionina	300,00 mg
Biotina	0,26 mg		
Colina	1.100 mg		



### 3.4 Protocolo Experimental

Os animais receberam tratamento com o beta-caroteno na forma de gavagem durante quatorze dias, com intervalo de 24 h entre cada dose. A injeção intraperitoneal do agente antitumoral foi feita no décimo quarto dia de tratamento, 24 h antes da eutanásia (Figura 3). Para a avaliação do efeito antimutagênico, o antitumoral utilizado foi a doxorubicina (16 mg/Kg p.c.). Foi utilizado óleo de milho da marca Liza<sup>®</sup>, adquirido no comércio local, como solvente para administração do beta-caroteno puro. A composição nutricional do óleo de milho está representada na Tabela 3. O solvente utilizado para administração das microcápsulas e do beta-caroteno microencapsulado foi água destilada.

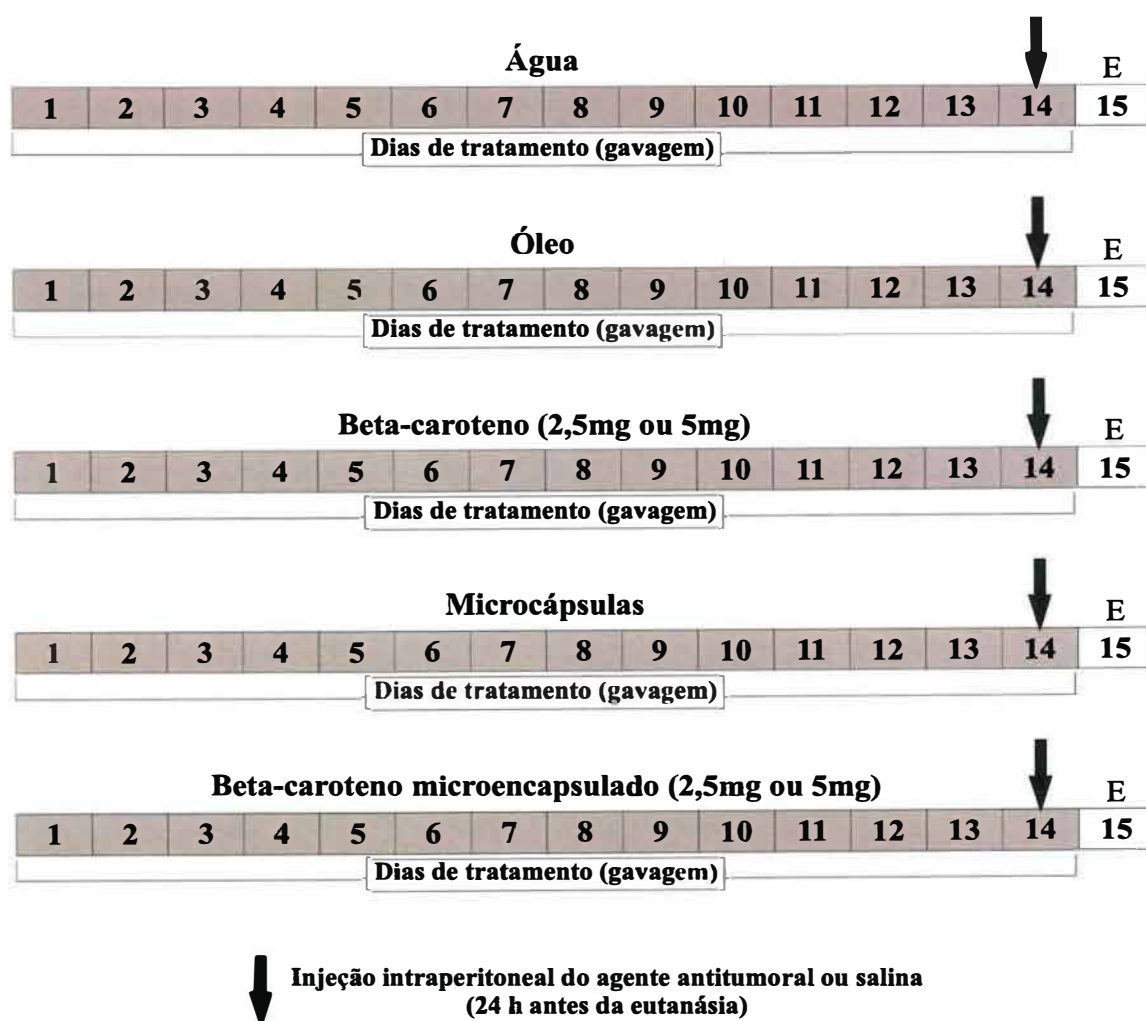


Figura 3 - Representação esquemática do protocolo de tratamento. E: Eutanásia.

Tabela 3 - Composição nutricional do óleo de milho utilizado como solvente na gavagem do beta-caroteno puro

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

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

Os animais foram distribuídos aleatoriamente em 14 grupos de tratamento (n=6/grupo):

- **GRUPOS CONTROLE NEGATIVO:**

- Grupo Controle Água: os animais receberam gavagem de água destilada (0,2 mL/100g p.c), seguida de solução salina i.p. (0,5 mL/100g p.c).
- Grupo Controle Óleo: os animais receberam gavagem de óleo de milho (0,2 mL/100g p.c), seguida de solução salina i.p. (0,5 mL/100g p.c).
- Grupo Controle Microcápsulas: os animais receberam gavagem de solução contendo as microcápsulas sem o beta-caroteno (0,2 mL/100g p.c), seguida de solução salina i.p. (0,5 mL/100g p.c).

- **GRUPOS CONTROLE POSITIVO:**

- Grupo Antitumoral (doxorrubicina): os animais receberam gavagem de água destilada (0,2 mL/100g p.c) antes do antitumoral i.p. (0,5 mL/100g p.c).
- Grupo Óleo x Doxorrubicina: os animais receberam gavagem de óleo de milho (0,2 mL/100g p.c) antes do antitumoral i.p. (0,5 mL/100g p.c).
- Grupo Microcápsulas x Doxorrubicina: os animais receberam gavagem de solução contendo as microcápsulas sem o beta-caroteno (0,2 mL/100g p.c), seguida da administração do antitumoral i.p. (0,5 mL/100g p.c).

- **GRUPOS EXPERIMENTAIS:**

- Grupos experimentais beta-caroteno puro + salina: os animais receberam gavagem de duas doses diferentes do beta-caroteno (2,5 ou 5mg/kg p.c.) (0,2 mL/100g p.c) puro antes de solução salina i.p. (0,5 mL/100g p.c).
- Grupos experimentais beta-caroteno puro + doxorrubicina: os animais receberam gavagem das doses do beta-caroteno (2,5 ou 5mg/kg p.c.) (0,2 mL/100g p.c) puro antes do antitumoral i.p. (0,5 mL/100g p.c)
- Grupos experimentais beta-caroteno microencapsulado + salina: os animais receberam gavagem de duas doses diferentes do beta-caroteno (2,5 ou 5mg/kg p.c.) (0,2 mL/100g p.c) microencapsulado antes de solução salina i.p. (0,5 mL/100g p.c)
- Grupos experimentais beta-caroteno microencapsulado + doxorrubicina: os animais receberam gavagem das doses do beta-caroteno microencapsulado (2,5 ou 5mg/kg p.c.) (0,2 mL/100g p.c) antes do antitumoral i.p. (0,5 mL/100g p.c)

### 3.5 Monitoração do Peso dos Animais

Durante todos os dias de tratamento, antes da realização da gavagem, verificou-se o peso de cada animal para a administração correta de cada dose em relação ao peso. A balança utilizada foi da marca Marte, modelo 015000. O acompanhamento do ganho de peso do animal também é necessário para que se verifique se o tratamento por gavagem está provocando perda de peso no animal.

No décimo quinto dia, 24h após a aplicação da última gavagem e injeção do antitumoral i.p., foi realizada a eutanásia dos animais. Após serem anestesiados com hidrato de cloral (0,4mL/100g p.c.), os animais foram decapitados.

### 3.6 Ensaio do Micronúcleo em Medula Óssea

O teste do micronúcleo em células da medula óssea de roedores foi desenvolvido por Schmid (1975) e posteriormente modificado. O procedimento foi seguido de acordo com as recomendações propostas pela Sociedade Brasileira de Mutagênese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental (RIBEIRO, 2003). Depois de decapitados, as epífises distais dos fêmures dos animais foram cortadas. A medula óssea foi retirada dos fêmures, com o auxílio de uma seringa de vidro contendo 1 mL de soro bovino fetal (temperatura ambiente), e o material foi colocado dentro de um tubo de centrífuga contendo mais 1 mL do soro. O material foi homogeneizado com o auxílio de pipeta Pasteur. As células foram centrifugadas por 10 minutos a 800 RPM e uma parte do sobrenadante foi descartada. O “*pellet*” foi ressuspenso no restante do sobrenadante (em torno de 0,3 mL). Uma gota de suspensão da medula óssea foi colocada em uma das extremidades de uma lâmina de vidro limpa e seca fazendo-se um esfregaço com o auxílio de uma lamínula de vidro. Após 24 horas, as lâminas foram fixadas em metanol absoluto por 10 minutos. Após 24 horas da fixação, as lâminas foram coradas com Giemsa diluído em tampão fosfato ( $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  0,06M e  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  0,06M –

pH 6,8), na proporção de 1 mL do corante para 20 mL da solução tampão, por 8 minutos. As lâminas foram lavadas em água destilada e secas em temperatura ambiente. Para cada animal foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs). As lâminas foram codificadas e analisadas em teste cego, utilizando microscópio de luz, em objetiva de 40X. A análise dos micronúcleos (MN) foi feita seguindo os critérios descritos por Salamone et al. (1980) e Titenko-Holland et al. (1997):

- a) células íntegras, com uma aparência arredondada e citoplasma intacto;
- b) micronúcleos nunca podem ser refringentes;
- c) micronúcleos devem estar no mesmo plano da célula;
- d) micronúcleos devem sempre apresentar forma arredondada.

### **3.6.1 Análise da Relação entre Eritrócitos Policromáticos/Normocromáticos**

Nesta avaliação foram analisados 500 eritrócitos, sendo estabelecida a relação entre o número de eritrócitos policromáticos e eritrócitos normocromáticos (PCE/NCE) em 500 células. Esta análise pode fornecer indícios de que a substância administrada está diminuindo a produção de novos eritrócitos (policromáticos). Se isto ocorrer, o agente testado poderá ser considerado citotóxico (GOLLAPUDI e MCFADDEN, 1995). Considera-se eritrócito policromático, um eritrócito imaturo, em um estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda contém ribossomos e, portanto pode ser distinguido do eritrócito normocromático (eritrócito maduro) por coloração seletiva para ribossomos (RIBEIRO et al., 2003) (Figura 4).

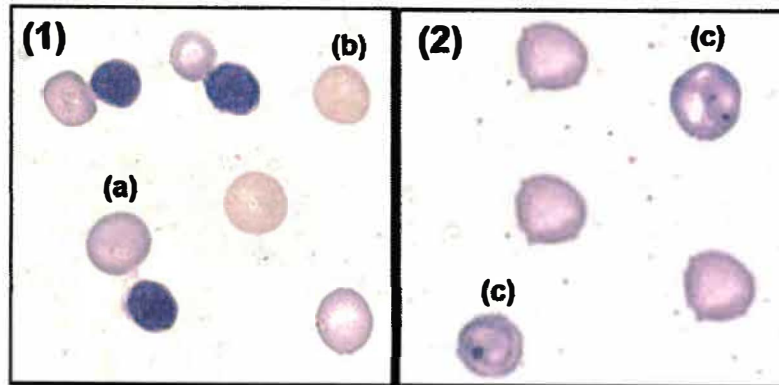


Figura 4 - Fotomicrografia de eritrócitos policromáticos e normocromático de medula óssea de ratos. Aumento original 100x, coloração Giemsa. Fonte: Laboratório de Bromatologia e Nutrição e Nutrigenômica, USP – 2008.

(1) (a) Eritrócito policromático (PCE)

(b) Eritrócito normocromático (NCE)

(2) (c) Eritrócito policromático micronucleado (MNPCE)

### 3.7 Técnica do Micronúcleo em Sangue Periférico de Ratos

O protocolo da técnica do micronúcleo em sangue periférico de roedores foi seguido de acordo com Hayashi et al. (1990). O sangue foi coletado da veia caudal, 24 horas após a administração do antitumoral, com o animal previamente anestesiado com solução de hidrato de cloral 10% na dose de 0,4mL/100g p.c.. O sangue foi gotejado diretamente sobre a lâmina e com uma lamínula foi feito um esfregaço. Após 24 horas, o material foi fixado em metanol por 10 minutos e seco em temperatura ambiente. As lâminas foram coradas com Laranja de Acridina (125µg/mL, Sigma-Aldrich) 1 min antes da análise em microscópio de fluorescência, da marca Carl Zeiss, modelo Axiostar Plus (luz azul 488nm e filtro amarelo, objetiva de 40x). Para a análise citológica das lâminas, foi observada a incidência de micronúcleo em 2000 reticulócitos. A preparação e coloração das lâminas foram feitas de acordo com os critérios descritos por Celik, Ogenler e Cömelekoglu (2005).

### **3.8 Ensaio do Cometa**

#### **3.8.1 Isolamento e Viabilidade Celular**

O ensaio do cometa foi realizado no rim e fígado seguindo o método descrito por Singh et al. (1988) e Tice et al. (2000). Durante o processamento das amostras, estas foram mantidas em gelo, protegidas da luz direta e processadas imediatamente após a eutanásia. Células isoladas foram obtidas dos órgãos que foram picotados em 1 mL de solução de Hanks. Determinou-se a proporção de células viáveis no homogenato pela técnica de exclusão por azul de tripan 0,4%. Este é um método para determinar a viabilidade em células isoladas, sugerido por Burlinson et al. (2007).

#### **3.8.2 Preparo das Lâminas**

Após o isolamento das células, adicionou-se solução de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) na proporção de 1:4, e transferiu-se 80µL da mistura para uma lâmina convencional pré-coberta com agarose 1,5%, cobrindo-a com uma lamínula (24 x 60mm). As lâminas foram mantidas em repouso por 10 minutos a 4°C para solidificação da agarose. Após a retirada das lamínulas, as lâminas foram imersas em solução de lise (NaCl 2,5M, EDTA 100mM, Tris 10mM, DMSO 10%, Triton X-100 1%, pH 10) por 20-22h a 4°C. Em seguida, transferiram-se as lâminas por 20 minutos para tampão alcalino (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM, pH > 13, 4°C), para permitir o desenrolamento do DNA e a expressão de quebras de fita simples e sítios álcali lábeis. A eletroforese horizontal foi realizada a 25 V e 300 mA (0,74V/cm) durante 20 minutos, usando o tampão alcalino de eletroforese (NaOH 300mM, EDTA 1mM, pH > 13, 4°C). Todas estas etapas foram conduzidas sem a presença de luz direta, para inibir a ocorrência de alterações adicionais ao DNA. Após a eletroforese, neutralizou-se as lâminas com solução de neutralização (Tris

0,4M, pH 7,5 a 4° C) por 5 minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, fixadas em etanol absoluto por 2 minutos, e após estarem secas, foram armazenadas a temperatura ambiente.

### **3.8.3 Análise das Lâminas do Ensaio do Cometa**

A análise das lâminas foi realizada no Laboratório de Bromatologia e Nutrição da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Imediatamente antes das análises, as lâminas foram coradas com solução de brometo de etídio 20 µg/mL. Os nucleóides foram identificados em microscópio de fluorescência (AxioStar Plus, Carl Zeiss Axio Cam MRc - AxioVision 3.1) utilizando filtro 516-560nm, barreira de filtro de 590nm, e aumento de 400X. As imagens de pelo menos 100 campos aleatórios foram fotografadas a partir de duas lâminas em código cego e submetidas à análise por sistema de imagem (CometScore<sup>®</sup>, versão 1.5, TriTek Corporation, disponível no endereço [http://autocomet.com/products\\_cometscore.php](http://autocomet.com/products_cometscore.php)). O parâmetro selecionado para análise foi a intensidade da cauda (% DNA na cauda). Este parâmetro é expresso em unidades arbitrárias e a média dos resultados foi utilizada para expressar o resultado por animal nos grupos experimentais. A Figura 5 ilustra o cometa obtido em tecido.





Figura 5 - Fotomicrografia obtida de células de rim de rato tratado com doxorubicina (16 mg/Kg p.c.) pela análise do cometa em microscópio de fluorescência. O nucleóide apresenta alterações no DNA. Coloração brometo de etídio. Aumento 400X.

### 3.9 Forma de Análise dos Resultados

Os dados foram verificados quanto à normalidade pelo Teste K-S (Teste Kolmogorov-Smirnov) e foram analisados pelo teste *t* de *student*, por meio do programa estatístico GraphPad Software 3.0. O nível de significância é de  $\alpha=0,05$ .

A análise estatística foi feita com base nas comparações entre:

- grupos tratados com o beta-caroteno puro ou microencapsulado e o controle negativo; e
- grupos tratados com o beta-caroteno puro ou microencapsulado associados à doxorubicina e o controle positivo.

Os valores apresentados nos resultados correspondem à Média  $\pm$  Desvio Padrão de cada grupo.



## 4. RESULTADOS

### 4.1 Monitoração do Peso dos Animais

Por meio da análise da média do ganho total de peso de cada grupo, demonstrado na Figura 6, pode-se observar que embora alguns grupos tenham apresentado menor ganho de peso em relação ao Controle Negativo, não foi verificada diferença estatística. Apenas o grupo Microcápsulas+DXR apresentou diferença em relação ao Controle Negativo ( $p<0,05$ ).

Na análise da relação entre o peso dos rins e fígado e o peso corpóreo do animal, demonstrada nas Tabelas 4 e 5 respectivamente, observa-se que não houve diferença estatística entre os grupos controles e grupos experimentais ( $p>0,05$ ).

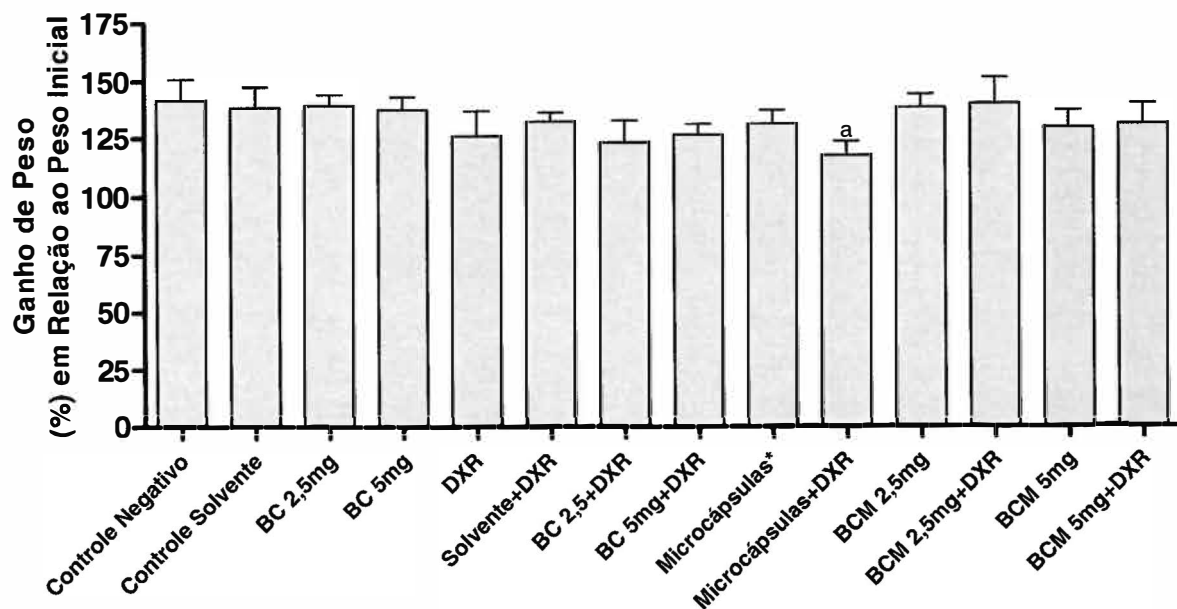


Figura 6 - Porcentagem do ganho de peso em relação ao peso inicial de ratos Wistar tratados com duas doses (2,5 ou 5 mg/kg p.c.) de beta-caroteno puro (BC) ou microencapsulado (BCM), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.), logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia.

Solvente = óleo de milho. \*Microcápsulas sem beta-caroteno. Média  $\pm$  desvio padrão.

<sup>a</sup> Diferente do grupo controle negativo ( $p<0,05$ ). Teste *t* de Student.

Tabela 4 – Razão, em porcentagem, entre o peso dos rins e fígado e o peso corpóreo de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia

Tratamento	Relação Peso Rins / Peso corpóreo (%)			Relação Peso Fígado / Peso corpóreo (%)		
		±			±	
Controle Negativo	0,80	±	0,05	4,74	±	0,39
Controle Solvente	0,83	±	0,07	4,46	±	0,45
BC 2,5mg	0,80	±	0,05	4,43	±	0,22
BC 5mg	0,89	±	0,09	4,65	±	0,42
DXR	0,87	±	0,07	4,87	±	0,44
Solvente+DXR	0,83	±	0,06	4,81	±	0,39
BC 2,5mg+DXR	0,82	±	0,07	4,77	±	0,39
BC 5mg+DXR	0,89	±	0,09	4,89	±	0,19

Solvente = óleo de milho. Média ± desvio padrão. Teste *t* de Student ( $p>0,05$ ).

Tabela 5 – Razão, em porcentagem, entre o peso dos rins e fígado e o peso corpóreo de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia

Tratamento	Relação Peso Rins / Peso corpóreo (%)			Relação Peso Fígado / Peso corpóreo (%)		
		±			±	
Controle Negativo	0,80	±	0,05	4,74	±	0,39
Microcápsulas*	0,80	±	0,04	4,90	±	0,32
BCM 2,5mg	0,88	±	0,05	4,76	±	0,20
BCM 5mg	0,88	±	0,05	4,95	±	0,22
DXR	0,87	±	0,07	4,87	±	0,44
Microcápsulas+DXR	0,78	±	0,17	5,17	±	0,31
BCM 2,5mg+DXR	0,79	±	0,07	4,68	±	0,31
BCM 5mg+DXR	0,80	±	0,03	5,24	±	0,40

\*Microcápsulas sem beta-caroteno. Média ± desvio padrão. Teste *t* de Student ( $p>0,05$ ).

#### 4.2 Ensaio do Micronúcleo em Medula Óssea e Sangue Periférico

A tabela 6 mostra a frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) em células da medula óssea e sangue periférico e a porcentagem de eritrócitos policromáticos (PCE) em relação a eritrócitos totais em células da medula óssea, nos grupos tratados com o beta-caroteno puro (BC) e seus controles. Os resultados da porcentagem de PCE, utilizada para avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento mostram que os grupos tratados não apresentaram citotoxicidade ( $p>0,05$ ), com exceção do grupo BC 5mg+DXR. Este grupo apresentou menor porcentagem de PCE em relação ao Controle Negativo ( $p<0,05$ ).

Por meio da análise de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) na medula óssea e no sangue periférico (Tabela 6), pôde-se observar que a frequência de micronúcleos entre o grupo Controle Negativo (água) e o Controle Solvente (óleo de milho) foram semelhantes ( $p>0,05$ ). Também foi possível observar que a dose BC 2,5mg não foi mutagênica nestas condições experimentais, visto que a frequência de micronúcleos foi semelhante àquela observada no grupo Controle Negativo ( $p>0,05$ ) nos dois tecidos. No grupo BC 5mg, o aumento na frequência de micronúcleos foi estatisticamente significativo ( $p<0,05$ ) quando comparado aos grupos Controle Negativo, em ambos os tecidos. Como esperado, o grupo DXR (controle positivo) apresentou um aumento da frequência de micronúcleos em relação ao Controle Negativo, com diferença estatística ( $p<0,05$ ). Nos grupos tratados com a associação do beta-caroteno com a doxorrubicina, pôde-se observar que a dose BC 2,5mg+DXR foi antimutagênica, enquanto que a dose BC 5mg+DXR não foi capaz de proteger contra a ação mutagênica da doxorrubicina (Tabela 6). Embora os resultados sejam semelhantes em ambos os tecidos, foi possível observar diferença estatística em relação aos grupos controles ( $p<0,05$ ) apenas na análise feita na medula óssea dos animais.

Tabela 6 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) em células da medula óssea e sangue periférico e porcentagem de eritrócitos policromáticos em relação a eritrócitos totais em células da medula óssea de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia

Tratamento	Medula Óssea		Sangue Periférico	
	(%) PCE / Eritrócitos Totais	MNPCEs / 1000 PCEs	MNPCEs / 1000 PCEs	
Controle Negativo	52,43 ± 3,73	1,08 ± 1,02	1,67 ± 1,33	
Controle Solvente	57,33 ± 10,71	1,08 ± 1,07	3,00 ± 4,53	
BC 2,5mg	62,43 <sup>a</sup> ± 9,27	0,92 ± 0,92	1,98 ± 2,12	
BC 5mg	57,94 ± 8,51	5,67 <sup>ab</sup> ± 4,84	6,75 <sup>a</sup> ± 4,54	
DXR	57,91 ± 8,43	7,00 <sup>ab</sup> ± 6,16	8,58 <sup>a</sup> ± 7,07	
Solvente+DXR	53,95 ± 3,28	8,00 <sup>ab</sup> ± 4,25	11,87 <sup>ab</sup> ± 9,37	
BC 2,5mg+DXR	61,83 <sup>a</sup> ± 11,86	1,92 <sup>cd</sup> ± 1,63	4,66 ± 2,73	
BC 5mg+DXR	31,23 <sup>acd</sup> ± 4,73	10,50 <sup>ab</sup> ± 4,18	8,67 ± 3,60	

Média ± Desvio Padrão. 2000 células analisadas por animal em cada tecido, n=6. Controle solvente = óleo de milho. Teste *t* de Student.

<sup>a</sup> Diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> Diferente do grupo controle solvente ( $p < 0,05$ ).

<sup>c</sup> Diferente do grupo DXR ( $p < 0,05$ ).

<sup>d</sup> Diferente do grupo Solvente+DXR ( $p < 0,05$ ).

Também foi feita a análise da frequência de MNPCE em células da medula óssea e sangue periférico e a porcentagem de PCE em relação a eritrócitos totais em células da medula óssea, nos grupos tratados com o beta-caroteno microencapsulado (BCM) e seus controles, conforme apresentado na Tabela 7. Os resultados da porcentagem de PCE, utilizada para avaliação da citotoxicidade induzida pelo tratamento, mostram que os grupos tratados não apresentaram citotoxicidade ( $p > 0,05$ ), com exceção do grupo Microcápsulas+DXR, que apresentou menor porcentagem de PCE em relação ao Controle Negativo ( $p < 0,05$ ).

De acordo com os resultados na análise de micronúcleos podemos observar que o grupo tratado apenas com as Microcápsulas, ou seja, sem o beta-caroteno, não apresentou mutagenicidade, pois apresentou resultados semelhantes ao grupo Controle Negativo ( $p>0,05$ ). Os grupos tratados com as duas doses do beta-caroteno microencapsulado, BCM 2,5mg e BCM 5mg também não apresentaram aumento no número de micronúcleos em comparação ao Controle Negativo ( $p>0,05$ ). O grupo Microcápsulas+DXR apresentou valores semelhantes ao grupo DXR ( $p>0,05$ ), mostrando que a microcápsula *per si* não foi capaz de proteger contra a mutagenicidade induzida pela doxorrubicina. No grupo BCM 2,5mg+DXR não foi observada proteção do carotenóide sobre os danos induzidos pela DXR. No grupo BCM 5mg+DXR, houve redução na formação de micronúcleos, embora não tenha sido observada diferença estatística do grupo DXR ( $p>0,05$ ) (Tabela 7). Estes resultados foram semelhantes nos dois tecidos estudados.

Tabela 7 - Frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE) em células da medula óssea e sangue periférico e porcentagem de eritrócitos policromáticos em relação a eritrócitos totais em células da medula óssea de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia

Tratamento	Medula Óssea		Sangue Periférico	
	(%) PCE / Eritrócitos Totais	MNPCEs / 1000 PCEs	MNPCEs / 1000 PCEs	
Controle Negativo	52,43 ± 3,73	1,08 ± 1,02	1,67 ± 1,33	
Microcápsulas*	57,67 ± 11,73	2,50 ± 1,76	3,08 ± 2,10	
BCM 2,5mg	41,46 <sup>a</sup> ± 3,51	0,75 <sup>b</sup> ± 0,52	2,50 ± 2,09	
BCM 5mg	61,32 ± 15,91	1,08 ± 0,97	1,96 ± 1,11	
DXR	57,91 ± 8,43	7,00 <sup>a</sup> ± 6,16	8,58 <sup>a</sup> ± 7,07	
Microcápsulas+DXR	29,81 <sup>a</sup> ± 2,81	10,33 <sup>ab</sup> ± 4,41	10,39 <sup>a</sup> ± 4,66	
BCM 2,5mg+DXR	51,69 ± 14,86	10,92 <sup>a</sup> ± 7,41	8,65 ± 4,54	
BCM 5mg+DXR	47,72 ± 6,02	4,50 <sup>a</sup> ± 2,14	5,35 ± 3,50	

Média ± Desvio Padrão. 2000 células analisadas por animal em cada tecido, n=6.

\* Microcápsulas sem beta-caroteno. Teste *t* de Student.

<sup>a</sup> Diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> Diferente do grupo Solvente Mic ( $p < 0,05$ ).



### 4.3 Ensaio do Cometa

Foi realizada a análise da viabilidade celular utilizando-se a técnica de exclusão de azul de tripan, na qual apenas as células não viáveis coram-se de azul. Este teste é importante para avaliar se os compostos estudados são citotóxicos e foi considerado como um método válido durante o "*Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: results of the in vivo Comet assay workgroup*", para se avaliar a viabilidade celular para a realização do ensaio do cometa (BURLINSON et al., 2007). Nesta análise, foi possível observar que a viabilidade de células hepáticas foi satisfatória compreendendo valores médios entre 80% e 93% (Tabelas 8 e 9) de células viáveis para a realização do teste do cometa. A viabilidade observada no homogenato feito com células renais alcançou valores médios entre 57% e 84% aproximadamente (Tabelas 8 e 9).

Tabela 8 – Médias da viabilidade celular, analisada através da técnica de exclusão por azul de tripan do homogenato obtido dos rins e fígado de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina ( DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia

Tratamento	Viabilidade Fígado (%)			Viabilidade Rim (%)		
Controle Negativo	92,73	±	2,48	61,34	±	18,28
Controle Solvente	83,93	±	5,72	57,62	±	12,17
BC 2,5mg	90,59	±	3,05	65,48	±	12,44
BC 5mg	88,57	±	5,00	67,25	±	5,63
DXR	81,78	±	7,13	66,89	±	15,23
Solvente+DXR	87,16	±	3,43	61,35	±	7,72
BC 2,5mg+DXR	91,81	±	2,58	83,42	±	8,02
BC 5mg+DXR	85,59	±	6,33	71,24	±	11,36

Média ± Desvio Padrão. Controle solvente = óleo de milho.

Tabela 9 – Médias da viabilidade celular, analisada através da técnica de exclusão por azul de tripan do homogenato obtido dos rins e fígado de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia

<b>Tratamento</b>	<b>Viabilidade Fígado (%)</b>			<b>Viabilidade Rim (%)</b>		
Controle Negativo	92,73	±	2,48	61,34	±	18,28
Microcápsulas*	90,77	±	6,02	74,40	±	6,86
BCM 2,5mg	92,27	±	2,20	60,39	±	17,23
BCM 5mg	89,69	±	6,81	67,61	±	3,79
DXR	81,78	±	7,13	66,89	±	15,23
Microcápsulas+DXR	87,04	±	2,82	81,86	±	11,44
BCM 2,5mg+DXR	92,17	±	0,71	71,23	±	11,47
BCM 5mg+DXR	89,32	±	5,35	73,81	±	8,74

Média ± Desvio Padrão. \* Microcápsulas sem beta-caroteno.

De acordo com o protocolo proposto por Tice et al. (2000), a relação da viabilidade celular entre o grupo tratado e o grupo controle não pode ser menor do que 70%. Neste contexto, em relação ao grupo controle, todas as análises de viabilidade celular do fígado e rim foram superiores a 88% e 93%, respectivamente.

As figuras 7 e 8 mostram os resultados obtidos pela migração de fragmentos de DNA das células de fígado e rins nos grupos tratados com o BC. Na análise das células hepáticas (Figura 7), os grupos tratados com o solvente e com as duas doses de BC não apresentaram diferença em relação ao Controle Negativo, o que indica que os tratamentos não induziram danos ao DNA. É possível observar que o tratamento com doxorrubicina foi genotóxico, pois foi diferente do Controle Negativo ( $p < 0,05$ ). Porém, nas associações dos tratamentos com a doxorrubicina, os três tipos de tratamentos foram capazes de proteger o DNA dos danos induzidos pela doxorrubicina ( $p < 0,05$ ), inclusive o tratamento com o próprio solvente (óleo de

milho) (Figura 7).

Nas células renais (Figura 8), os resultados foram semelhantes às células hepáticas, embora tenham apresentado porcentagem de dano maior do que no fígado, principalmente no Controle Negativo. O grupo Controle Solvente, embora tenha apresentado valores menores que o Controle Negativo, não apresentou diferença estatística. Já o grupo BC 2,5mg também apresentou valores menores, porém com diferença estatística em relação ao Controle Negativo. Também foi observada menor fragmentação do DNA no grupo BC 5mg, porém sem diferença estatística. Diferente do fígado, os resultados obtidos no grupo tratado somente com o DXR não apresentaram diferença estatística em relação ao Controle Negativo. Nas associações com a doxorrubicina, assim como no fígado, o grupo Controle Solvente+DXR (Figura 8) apresentou redução de dano semelhante aos grupos BC 2,5mg+DXR e BC 5mg+DXR. Os danos observados nestes três grupos foram menores do que o grupo DXR ( $p < 0,05$ ).

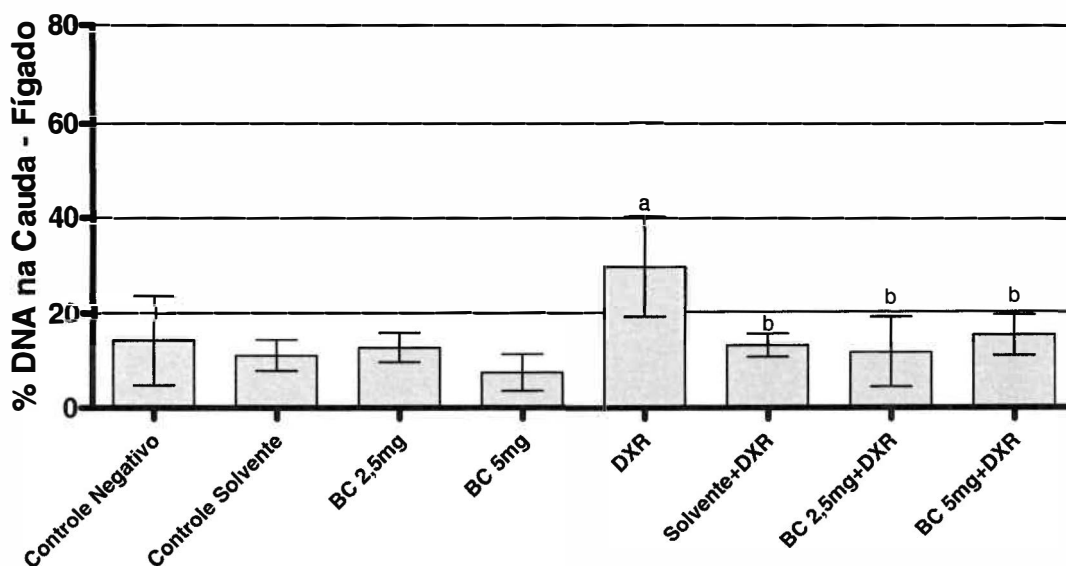


Figura 7 - Ensaio do Cometa no fígado de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno puro (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c.) logo após a última gavagem, intraperitonealmente 24h antes da eutanásia.

Média ± Desvio Padrão. 100 nucleóides analisados por animal,  $n=5$ .

Controle solvente = óleo de milho. Teste *t* de Student.

<sup>a</sup> Diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> Diferente do grupo DXR ( $p < 0,05$ ).

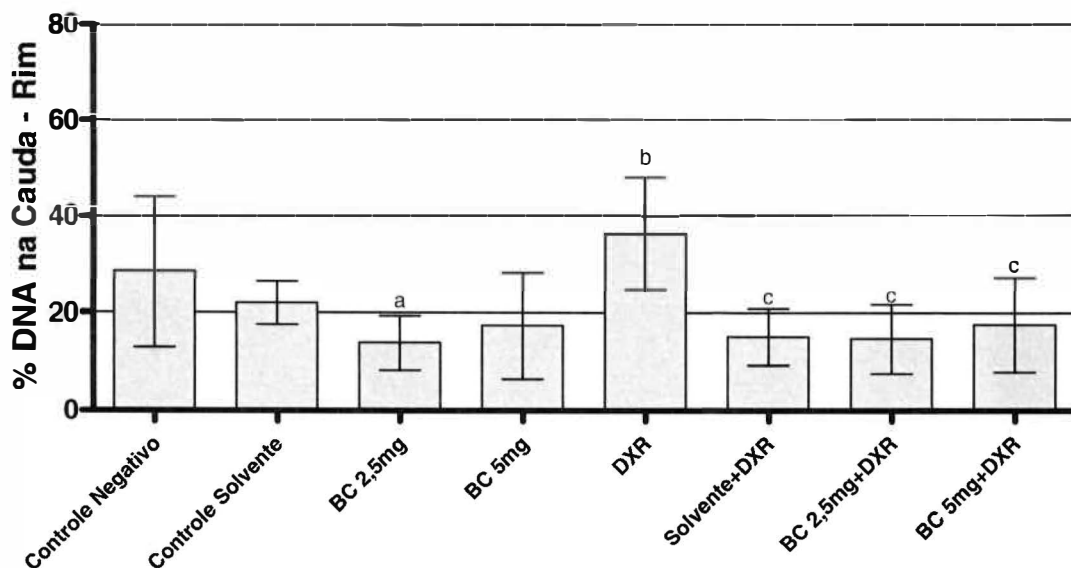


Figura 8 - Ensaio do Cometa no rim de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno puro (BC 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorubicina (DXR, 16 mg/Kg p.c.) logo após a última gavagem, intraperitonealmente 24h antes da eutanásia.

Média  $\pm$  Desvio Padrão. 100 nucleóides analisados por animal, n=5.

Controle solvente = óleo de milho. Teste *t* de Student.

<sup>a</sup> Diferente do grupo controle negativo ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> Diferente do grupo controle solvente ( $p < 0,05$ ).

<sup>c</sup> Diferente do grupo DXR ( $p < 0,05$ ).

Nos tratamentos feitos com o BCM (Figuras 9 e 10), pode-se observar que as doses não foram genotóxicas, pois apresentaram valores semelhantes ao Controle Negativo, tanto no fígado quanto no rim dos animais, embora a porcentagem de fragmentação do DNA ainda tenha sido maior nas células renais. No fígado (Figura 9), a indução de danos provocada pela DXR foi reduzida no grupo tratado com as Microcápsulas ( $p < 0,05$ ). Porém, as duas doses do BCM também foram efetivas na proteção, mostrando valores de fragmentação do DNA diferentes do controle positivo (DXR) e também do controle Microcápsulas+DXR ( $p < 0,05$ ). No rim (Figura 10), os resultados obtidos com os tratamentos do carotenóide associado à DXR foram diferentes entre as duas doses. Enquanto no grupo BCM 2,5mg+DXR a fragmentação do DNA foi maior do que no grupo Microcápsulas+DXR ( $p < 0,05$ ), a dose

BCM 5mg+DXR foi capaz de proteger a indução de danos observada no grupo Microcápsulas+DXR ( $p<0,05$ ).

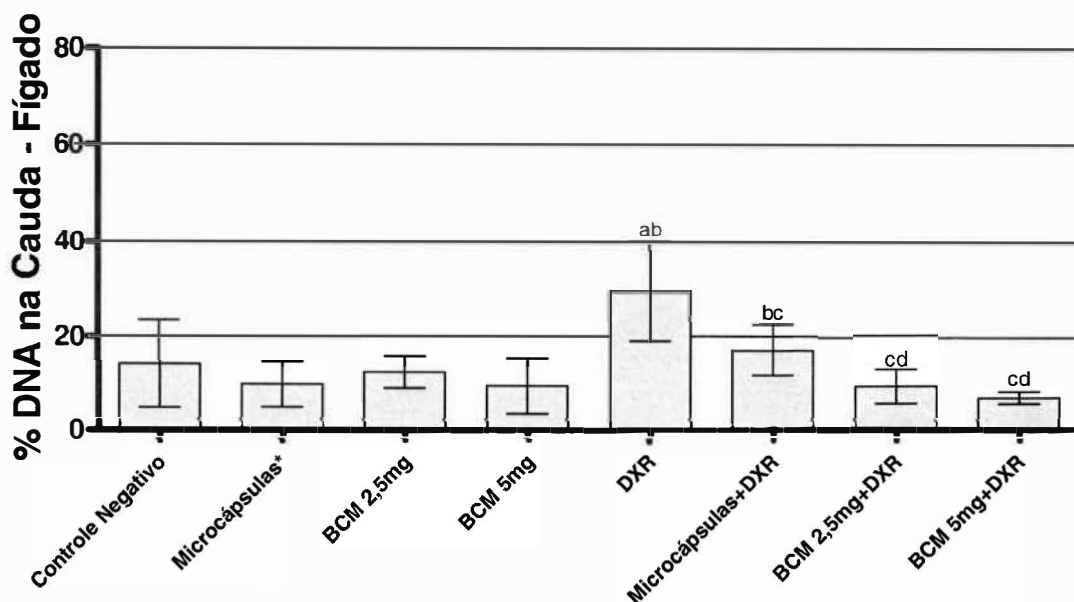


Figura 9 - Ensaio do Cometa no fígado de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina ( DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia.

Média ± Desvio Padrão. 100 nucleóides analisados por animal, n=5.

\* Microcápsulas sem beta-caroteno. Teste *t* de Student.

<sup>a</sup> Diferente do grupo controle negativo ( $p<0,05$ ).

<sup>b</sup> Diferente do grupo controle solvente ( $p<0,05$ ).

<sup>c</sup> Diferente do grupo DXR ( $p<0,05$ ).

<sup>d</sup> Diferente do grupo Microcápsulas+DXR ( $p<0,05$ ).

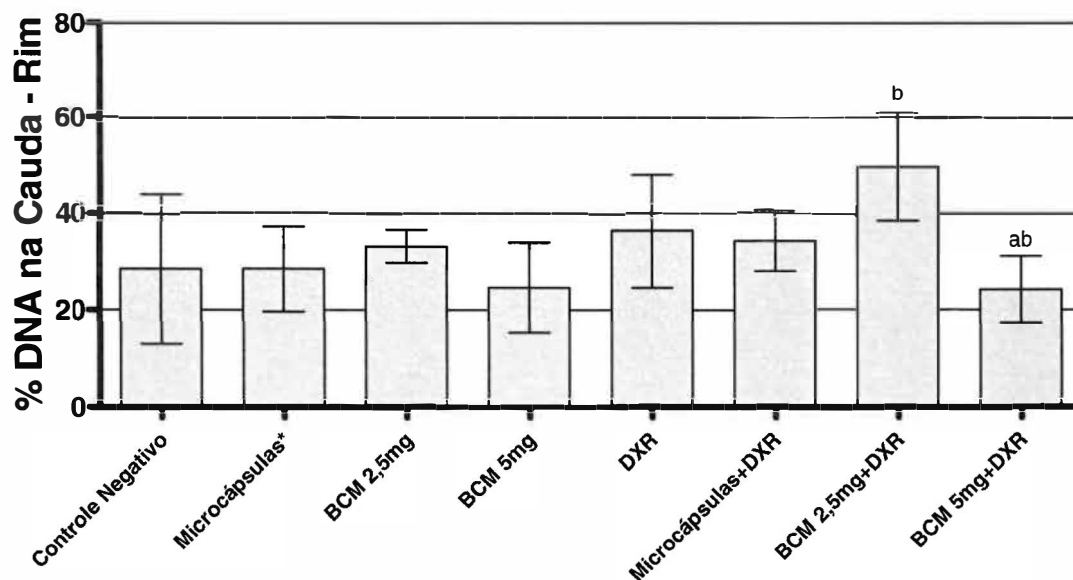


Figura 10 - Ensaio do Cometa no rim de ratos Wistar tratados com duas doses de beta-caroteno microencapsulado (BCM 2,5 ou 5 mg/kg p.c.), por gavagem durante 14 dias; seguida de injeção de salina ou doxorrubicina ( DXR, 16 mg/Kg p.c. i.p.) logo após a última gavagem, 24h antes da eutanásia.

Média ± Desvio Padrão. 100 nucleóides analisados por animal, n=5.

\* Microcápsulas sem beta-caroteno. Teste *t* de Student.

<sup>a</sup> Diferente do grupo DXR ( $p < 0,05$ ).

<sup>b</sup> Diferente do grupo Microcápsulas+DXR ( $p < 0,05$ ).



## 5. DISCUSSÃO

Testes de toxicologia genética *in vivo* têm sido usados para identificar o potencial mutagênico ou carcinogênico de compostos. Os resultados destes testes são usados para a complementação de estudos *in vitro* ou para a regulamentação dessas substâncias. No entanto, existe um esforço na comunidade científica para tentar diminuir o uso de animais nestes testes (PFUHLER et al.; 2009). Levando em consideração o problema da baixa especificidade dos testes *in vitro* para discriminar quais substâncias são carcinogênicas ou não-carcinogênicas em roedores (KIRKLAND et al.; 2005), o aperfeiçoamento destes testes (por exemplo redução de “falso positivos”) e principalmente a busca por novas alternativas de testes *in vivo*, que possibilitariam a redução do número de animais, tem sido um desafio para os profissionais de toxicologia genética.

Em um workshop realizado em 2006 pelo Centro Europeu Para Validação de Métodos Alternativos (*European Centre for the Validation of Alternative Methods*), foram discutidas estratégias para reduzir os resultados “falso positivos” de testes *in vitro* (KIRKLAND et al.; 2007). Embora o aprimoramento de testes *in vitro* poderia diminuir os testes *in vivo*, são necessários também esforços com o objetivo de diminuir o número de animais utilizados em testes *in vivo*. Isto, devido ao grande número de substâncias que são freqüentemente testadas quanto à sua genotoxicidade.

Contudo, para garantir a segurança na utilização de alguns compostos por humanos, mudanças recentes em protocolos de ensaios de genotoxicidade propõem o uso do mesmo animal para a realização de dois ou mais ensaios e a utilização de vários tecidos do mesmo animal (VASQUEZ, 2009). Portanto as recomendações para a diminuição do número de animais na realização de testes de genética toxicológica foram seguidas neste trabalho, pois utilizou-se apenas animais do sexo masculino, vários tecidos do mesmo animal, e os resultados gerados foram baseados na combinação de dois ensaios de genética toxicológica: o



teste do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico, e o ensaio do cometa em fígado e rins de roedores, que são testes amplamente aceitos por agências reguladoras.

Os grupos Controle Negativo e DXR (controle positivo) utilizados nesta pesquisa foram os mesmos para os dois tipos de tratamento, tanto para o beta-caroteno puro quanto para o beta-caroteno microencapsulado, pois os tratamentos foram realizados durante o mesmo período.

Estudos toxicológicos normalmente são divididos em quatro diferentes tempos de tratamento: agudo, sub-agudo, sub-crônico e crônico. De acordo com o livro de Casarett & Doull's (2008), o tratamento agudo é definido como uma única administração do agente e a coleta do material a ser estudada é feita em até 24 horas. No tratamento sub-agudo, o período de exposição a doses repetidas do agente é realizado em até 1 mês. O tratamento realizado durante 1 a 3 meses é considerado sub-crônico e o tratamento com mais de 3 meses é considerado crônico. Portanto, o período de 14 dias foi selecionado para avaliar a resposta do beta-caroteno em tratamento sub-agudo. Outros trabalhos envolvendo a suplementação de carotenóides também utilizaram o período de 14 dias para o tratamento por gavagem em roedores (VANITHA et al., 2007; KUMAR; KALONIA; KUMAR, 2009).

### **5.1 Monitoração do Peso dos Animais**

Ao contrário de outros trabalhos que mostraram uma perda significativa de peso em ratos Wistar tratados com quimioterápicos (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000), foi observado neste estudo uma tendência na redução de peso que não foi estatisticamente diferente do Controle Negativo. Este fato pode ser explicado pelo menor consumo de ração pelo animal durante o tratamento e pela observação apenas 24h após a administração do antitumoral, enquanto em outros protocolos esta observação foi feita sete dias após o tratamento (ANTUNES; DARIN; BIANCHI, 2000).

Também não foi observada alteração entre a relação do peso dos órgãos e o peso total dos animais entre os grupos tratados. A avaliação do peso de órgãos de animais é de fundamental importância nos estudos envolvendo a toxicidade de substâncias. Mudanças no peso dos órgãos são freqüentemente associadas aos efeitos do tratamento. Alterações do peso do fígado, por exemplo, pode sugerir que o tratamento induz hipertrofia hepatocelular. Por outro lado, mudanças no peso dos rins podem indicar que o tratamento está induzindo toxicidade renal, hipertrofia tubular ou nefropatia progressiva crônica (SELLERS et al.; 2007). Estudo realizado por Injac et al. (2008) também não observou alterações no peso dos rins de ratos Sprague-Dawley tratados com DXR (8mg/kg) 48h antes da eutanásia. Outro trabalho recente também não encontrou diferença no peso do fígado de ratos Wistar tratados com DXR (6mg/kg) 72h antes da eutanásia (PEREVERZEVA et al.; 2008).

## **5.2 Técnica do Micronúcleo em Medula Óssea**

Na análise das lâminas da medula óssea foi possível observar eritrócitos em diferentes fases de maturação, podendo ser reconhecidos claramente eritrócitos jovens e maduros. Os eritrócitos jovens apresentaram-se com formato circular, corado de azul pela técnica utilizada. Os eritrócitos maduros também apresentaram formato circular, e foram corados de salmão/laranja pelo corante Giemsa. A contagem de micronúcleos foi efetuada apenas nos eritrócitos jovens. Também foi feita a análise da porcentagem de PCE em relação aos eritrócitos totais. Esta porcentagem é útil para estimar qualquer perturbação no processo de hematopoiese devido ao tratamento. Um efeito nesta proporção (geralmente uma diminuição na proporção de PCE) é usado para demonstrar o efeito da substância teste sobre o tecido alvo. A porcentagem de PCE em relação aos eritrócitos totais, normalmente compreende valores entre 50 e 60% (GOLLAPUDI; MCFADDEN, 1995). Adicionalmente, conforme sugerido por Macgregor et al. (1987), as variações da porcentagem de PCE entre os grupos

tratados devem estar dentro de um limite de 10 a 20% em relação ao Controle Negativo.

Portanto, neste estudo, os resultados obtidos com os grupos BC 2,5mg e BC 2,5mg+DXR, embora estejam estatisticamente diferente do controle negativo, não podem ser considerados como sinais de alteração da proliferação celular. O grupo BC 5mg+DXR apresentou uma diminuição da porcentagem de PCE em relação ao Controle Negativo. Existem trabalhos demonstrando a ação tóxica do beta-caroteno em altas concentrações, porém não foram encontrados trabalhos na literatura relatando queda na proporção de PCE induzida por carotenóides. A DXR é capaz de inibir a proliferação celular na medula óssea, diminuindo a porcentagem de PCE. Estudo feito em camundongos por Venkatesh et al. (2007) demonstrou um declínio dose-dependente da proporção de PCE, alcançando nível máximo de declínio 72h após o tratamento em todas as doses de DXR utilizadas no estudo (5, 10 e 25mg/kg). No entanto, neste estudo a DXR não apresentou citotoxicidade na medula óssea, pois apresentou valores de PCE semelhantes ao grupo controle. Resende et al. (2007) também não encontraram diminuição na porcentagem de PCE em ratos Wistar depois de tratados com DXR (90mg/kg) 24h antes da eutanásia. De acordo com o que foi observado neste estudo, a associação do beta-caroteno puro com a DXR (BC 5mg+DXR) foi citotóxica em células da medula óssea. Este resultado poderia ser explicado pelo efeito sinérgico da alta dose do carotenóide associada à DXR, embora não existam trabalhos na literatura realizados nestas mesmas condições experimentais que corroborem os dados obtidos nesta análise.

O grupo Microcápsulas+DXR também demonstrou uma diminuição significativa da proporção de PCE. No entanto, devido à falta de estudos nestas condições experimentais envolvendo matrizes utilizadas no microencapsulamento associadas à doxorrubicina, torna-se difícil explicar a citotoxicidade observada neste grupo experimental. Por outro lado, nas administrações do beta-caroteno microencapsulado associados à doxorrubicina (BCM 2,5mg+DXR e BCM 5mg+DXR) não foi observada esta diminuição. Isto mostra que o beta-

caroteno microencapsulado não foi citotóxico.

A frequência de micronúcleos entre o grupo Controle Negativo e o grupo Controle Solvente foram semelhantes, o que significa que o óleo de milho (solvente), não induz ou reduz a formação de micronúcleos, ou seja, danos cromossômicos, quando comparado ao grupo Controle Negativo. Sendão et al. (2006), usando óleo de milho como solvente para administração de licopeno em ratos, durante quatro dias por gavagem, também não observaram alterações cromossômicas induzidas pelo solvente. Estudo feito por Evangelista et al. (2004) avaliou os efeitos dos óleos de oliva, extra-virgem, de canola e de milho sobre os efeitos clastogênicos da cisplatina em ratos Wistar. Foi verificado que o óleo de milho não induziu ou reduziu o número de aberrações cromossômicas na medula óssea dos animais.

É possível concluir que a dose BC 2,5mg não é mutagênica, visto que a frequência de micronúcleos foi semelhante àquela observada nos grupos controle. Resultado diferente da outra dose administrada (BC 5mg), onde houve aumento da frequência de micronúcleos. Danos cromossômicos induzidos por altas doses de carotenóides também foram observados em outros estudos. Foi demonstrado por Sendão et al. (2006) que no tratamento agudo com licopeno acima de 10mg/kg p.c., houve a indução de danos cromossômicos em ratos Wistar. Em um estudo *in vitro* realizado por Antunes et al., (2005), com aplicação de bixina em concentrações superiores a 10 µg/mL, foi verificado aumento no número de quebras cromossômicas em cultura de linfócitos de sangue periférico de humanos.

Como esperado, o grupo DXR (controle positivo) apresentou um aumento da frequência de micronúcleos em relação ao Controle Negativo. A dose utilizada neste tratamento (16mg/kg p.c.) foi baseada em outros estudos nos quais este antitumoral foi utilizado para avaliação de atividade antimutagênica em roedores (FERREIRA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010), sendo comprovado que a doxorubicina é um composto eficaz na produção de danos cromossômicos.

No grupo BC 2,5mg+DXR, foi observada proteção do carotenóide sobre a ação mutagênica da doxorubicina, pois houve diminuição da frequência de micronúcleos neste grupo. Este resultado em relação à proteção do beta-caroteno sobre a mutagenicidade da doxorubicina, provavelmente, está relacionado com seu caráter antioxidante. Salvadori et al. (1992) relataram, em camundongos, o mecanismo antimutagênico do beta-caroteno contra a ação mutagênica do antitumoral ciclofosfamida. Outro estudo com a bixina, demonstrou que este carotenóide também tem atividade antioxidante na proteção contra a peroxidação lipídica induzida pela cisplatina em ratos Wistar (SILVA et al., 2001). Vile e Winterbourn (1988) relataram o efeito protetor do beta-caroteno na inibição da peroxidação lipídica produzida por doxorubicina em microsomas de fígado de ratos. Estudos relataram proteção do retinol na peroxidação lipídica depois da administração da doxorubicina em vários tecidos de ratos, como no coração (TESORIERE et al, 1994), cérebro (CIACCIO et al., 1993) e rim (MONTILLA et al., 1998), mas falhou, em alguns experimentos na retina e fígado (CIACCIO et al., 1993). Rauscher, Edenharder e Platt (1998), pesquisando efeitos de carotenóides, relataram diminuição na formação de micronúcleos em medula óssea de roedores induzida pelo antitumoral ciclofosfamida.

No grupo BC 5mg+DXR, houve um aumento na frequência de micronúcleos quando comparado ao grupo BC 2,5mg+DXR. Este resultado mostra que o beta-caroteno, quando administrado em altas doses e concomitantemente à DXR, pode ser mutagênico. Existem alguns estudos mostrando a característica pró-oxidante de carotenóides, quando utilizados em altas concentrações em fumantes ou pessoas expostas ocupacionalmente aos asbestos (ATBC, 1994; OMENN, 1996). Wang e Russel (1999) sugerem que os compostos responsáveis pelo câncer de pulmão em fumantes, nestes casos, podem ser produzidos pela clivagem do beta-caroteno. Esta hipótese foi confirmada por Leo e Lieber (1999) que mostraram que a suplementação de beta-caroteno em fumantes que consomem álcool, aumentou o risco de

câncer de pulmão e de doenças cardiovasculares.

Mayne, Handelman e Beecher (1996) propuseram alguns mecanismos que podem explicar esta característica pró-oxidante do beta-caroteno. Entre eles, está a geração de grandes quantidades de produtos oxidantes provenientes de carotenóides, como epóxidos, quando expostos a quantidades significativas de espécies reativas de oxigênio. Além disso, o ataque de radicais livres aos carotenóides também resulta em subprodutos desta quebra. Estes subprodutos da clivagem do beta-caroteno podem contribuir para os efeitos mutagênicos. Um estudo feito por Alija et al.(2004) demonstrou que o tratamento em cultura de linfócitos de ratos, com subprodutos da clivagem do beta-caroteno, aumentou significativamente a formação de micronúcleos. Estes compostos induziram exponencialmente o número de aberrações cromossômicas, quando foram administradas apenas algumas doses dos compostos estudados, porém sem diferença estatística, devido à variação encontrada entre os diferentes tratamentos. A soma de fatores como o aumento de espécies reativas de oxigênio proporcionado pela administração da DXR e a associação com altas doses do beta-caroteno poderiam explicar essa mutagenicidade.

Embora tenha sido observada a possível ação pró-oxidante do beta-caroteno 5mg, esta dose foi proposta com base em uma revisão da literatura (SALVADORI et al., 1992; OBERMUELLER-JEVIC et al., 2002; MUKHERJEE et al., 1991; DURNEV et al., 1997) na busca por uma dose ideal para a realização deste estudo, tendo em vista que já havia o conhecimento desta possível ação pró-oxidante dos carotenóides em certas condições e concentrações. Com isso, a dose máxima de 5mg utilizada neste trabalho, foi efetivamente escolhida com base, principalmente na análise de um relatório publicado pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e *World Health Organization* (WHO) em 2002 (FAO/WHO, 2002), que estabelece a dose máxima de ingestão diária de beta-caroteno por humanos de 5mg/kg de peso corpóreo.

Na análise dos micronúcleos em medula óssea, as microcápsulas puras e o beta-caroteno microencapsulado nas duas doses (BCM 2,5mg e BCM 5mg) mostraram ausência de efeito mutagênico. O que difere do tratamento realizado com a dose de 5mg do beta-caroteno puro (BC 5mg), onde houve indução de dano. Este efeito poderia ser explicado pela diferença de biodisponibilidade do carotenóide quando administrado na forma microencapsulada, impossibilitando que, mesmo em dose alta produzisse efeito mutagênico. Sabe-se que o microencapsulamento de fármacos faz com que a liberação do produto encapsulado seja efetuada durante um longo período, impedindo uma dosagem excessiva indesejada e fazendo com que o organismo absorva o fármaco continuamente (MANCA; ROVAGLIO, 2003). O atraso, portanto, na absorção da substância microencapsulada também poderia ajudar a explicar os resultados encontrados nesta dose, pois o material encapsulado, mesmo em alta concentração não atingiria doses imediatas capazes de induzir mutagenicidade. A associação das microcápsulas com a doxorubicina (Microcápsulas+DXR) não foi capaz de proteger contra a ação mutagênica da doxorubicina, haja vista que não houve redução na frequência de micronúcleos. A formação de micronúcleos nos animais do grupo BCM 2,5mg+DXR também não foi reduzida. Isto demonstra que o beta-caroteno na dose de 2,5mg, quando microencapsulado, não apresenta atividade antimutagênica, oposto do que foi observado no tratamento com a mesma dose do carotenóide puro. Embora tenha sido observada redução na frequência de micronúcleos na dose de 5mg (BCM 5mg+DXR), quando comparado ao grupo DXR, esta dose não pode ser considerada antimutagênica, pois a redução não teve diferença estatística.

A ausência de trabalhos na literatura envolvendo o estudo de absorção e cinética de substâncias microencapsuladas dificulta a explicação dos resultados neste trabalho. Por outro lado, existem evidências demonstrando a eficiência do processo de microencapsulamento. Artigo publicado por Lingyun, Gabriel e Muriel (2006), descreve o potencial de proteínas

alimentares como material encapsulante em sistemas de liberação de compostos bioativos como vitaminas, probióticos, peptídeos bioativos e antioxidantes, em forma de hidrogel e micro ou nanopartículas. Licopeno encapsulado em proteínas de soro de leite teve sua disponibilidade aumentada a valores semelhantes à pasta de tomate, fonte mais eficiente de biodisponibilidade do licopeno para humanos (RICHELLE et al., 2002). Yoo et al. (2006) demonstraram que o alfa-tocoferol encapsulado em alginato de sódio foi efetivamente protegido quando exposto a simulações de fluido gástrico e amplamente liberado em modelos de fluido intestinal. Estudo recente relatou 80% de eficiência no microencapsulamento de licopeno em gelatina/sucrose por “*spray drying*”, embora não tenham feito estudo de atividade e liberação do carotenóide (SHU et al., 2006). Lambert, Weinbreck e Kleerebezem (2008) demonstraram que o microencapsulamento de enzimas biliares com goma arábica, foi eficiente na proteção destas enzimas em condições simuladas de fluido gástrico e foi eficiente também na liberação do produto encapsulado em condições entéricas.

### **5.3 Técnica do Micronúcleo em Sangue Periférico de Ratos**

Várias evidências têm indicado a confiabilidade na avaliação da frequência de micronúcleos em reticulócitos de sangue periférico, bem como em medula óssea. Esta análise em reticulócitos do sangue periférico era restrita ao camundongo devido ao consenso de que havia eliminação de eritrócitos micronucleados pelo baço de ratos (SCHLEGEL; MACGREGOR, 1984; HAYASHI et al., 1992). Contudo, no segundo *International Workshop on Genotoxicity Testing* (IWGT) em Washington D.C. em 1999, foi discutido o uso de sangue periférico de ratos como células-alvo na análise de micronúcleos, assim como o uso de sangue periférico de camundongos baseados nos dados experimentais de alguns autores (WAKATA et al., 1998; HAMADA et al., 2001). Entretanto, em 1999 o grupo foi incapaz de alcançar um consenso, pois ainda havia uma preocupação acerca da função esplênica de ratos.



Em 2005, porém, o grupo chegou a um consenso. Foram acumuladas evidências suficientes, mostrando que os reticulócitos micronucleados de sangue periférico de ratos são populações de células aceitáveis para o teste do micronúcleo, tanto em ratos como em camundongos (HAYASHI et al., 2007).

A eficácia da técnica vem sendo comprovada com estudos recentes envolvendo a avaliação da mutagenicidade *in vivo* de diversos compostos pelo micronúcleo de sangue periférico (SELVAKUMAR et al., 2006; MEDOLA et al., 2007; VAN MIERT et al., 2008). Além disso, dados preliminares sugerem que o sangue periférico pode ser uma amostra aceitável de tecido também em outras espécies, incluindo humanos (DERTINGER et al., 2003; ABRAMSSON-ZETTERBERG et al., 2000; MACGREGOR; WEHR; GOULD, 1980). Portanto, o teste de micronúcleo em sangue periférico de ratos é uma valiosa ferramenta para avaliação de compostos possivelmente mutagênicos (VAN MIERT et al., 2008).

Os resultados do teste do micronúcleo em sangue periférico foram semelhantes aos resultados obtidos com a medula óssea, demonstrando que tanto a formação de micronúcleos quanto a atividade antimutagênica do beta-caroteno foi semelhante nos dois tecidos. No entanto, foi observada uma frequência de micronúcleos maior no sangue periférico. Com base na cinética de formação dos reticulócitos e sua movimentação da medula óssea para o sangue, a frequência de micronúcleos em sangue periférico normalmente é semelhante àquela observada 24h antes na medula óssea (MACGREGOR et al., 1987). Portanto, quando ambos tecidos são coletados ao mesmo momento, espera-se encontrar uma frequência menor de micronúcleos no sangue periférico. O que dificulta a interpretação dos dados obtidos neste trabalho. Contudo, alguns trabalhos já relataram resultados semelhantes. Resende et al. (2007) também encontraram em camundongos frequência maior de micronúcleos em sangue periférico quando comparado à medula óssea. Por exemplo, no grupo controle negativo a frequência de MNPCE/1000 foi 0,67 em medula óssea, comparado com 1,92 em células

sanguíneas. Em todos os tratamentos com extrato de *Baccharis dracunculifolia*, as frequências de micronúcleo foram maiores em sangue do que em medula óssea. Resultados semelhantes foram publicados por Aparecida Resende et al. (2006). Yamagishi et al. (2001) também encontraram frequência maior de MNPCE em sangue periférico de animais do grupo controle ( $\approx 2,0$ ) quando comparados à medula óssea (1,7). A frequência no grupo tratado com mitomicina, e sacrificados 24h depois da injeção i.p. foram muito similares em sangue periférico e medula óssea de camundongos. Delmanto et al. (2001) usando o teste do micronúcleo, encontraram no grupo controle a frequência de 0,08 em medula óssea e 0,21 em sangue periférico. O grupo controle positivo tratado com ciclofosfamida mostrou uma frequência de 1,33 em medula óssea e 1,42 em sangue periférico.

#### **5.4 Ensaio do Cometa**

Camundongos e ratos têm sido amplamente utilizados no ensaio do cometa como modelos animais para a avaliação da genotoxicidade *in vivo*. O ensaio do cometa *in vivo* foi aceito como um teste válido para ser aplicado em testes de compostos químicos em alimentos, produtos de consumo e no meio ambiente (DHAWAN; BAJPAYEE; PARMAR, 2009) e recomendado para complementar resultados de testes positivos *in vitro*. Agências reguladoras internacionais recomendam a utilização deste teste como parte da bateria de testes na avaliação da genotoxicidade de compostos *in vivo* (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Para a obtenção de resultados confiáveis, existem protocolos específicos para a execução do ensaio do cometa *in vivo* (TICE et al., 2000; HARTMANN et al., 2003; BURLINSON et al., 2007). Múltiplos órgãos de camundongos e ratos incluindo cérebro, sangue, rins, pulmões, fígado e medula óssea têm sido utilizados para o abrangente entendimento da genotoxicidade de agentes químicos (SASAKI et al., 2000; SEKIHASHI et al., 2002; MENG; QIN; ZHANG, 2005; PATEL et al., 2006). Os órgãos de ratos ou camundongos utilizados para determinado

estudo, que apresentam altos níveis de fragmentação, não são necessariamente os órgãos sujeitos ao processo de carcinogênese, embora para a elucidação da carcinogenicidade de um composto, um estudo órgão-específico é necessário, porém não o suficiente (SASAKI et al., 2002).

O ensaio do cometa pode ser aplicado em qualquer tecido. Porém, com exceção dos tecidos que devem ser utilizados como alvo de agentes químicos específicos (por exemplo, bexiga para algumas aminas aromáticas), o tecido mais apropriado é o fígado, seguido do intestino quando aquele for negativo para genotoxicidade (TICE et al., 2000). Porém, a escolha dos rins como tecido-alvo para avaliação de genotoxicidade, também torna-se importante devido à nefrotoxicidade da doxorubicina (DE JONGE; VERWEIJ, 2006).

Dados baseados no estudo de Sasaki et al. (2000), sugerem que o melhor período para coleta de amostra para o ensaio do cometa *in vivo* é de 3 a 6h e de 22 a 26h, tanto para o tratamento por administração oral quanto intraperitoneal. Outros estudos com o ensaio do cometa *in vivo* corroboram estas sugestões (TICE et al., 2000). Portanto o período de coleta de 24h realizado neste trabalho está de acordo com as recomendações da literatura.

Embora não haja restrição para a análise de cometas por escore, no qual os danos ao DNA são classificados visualmente e classificados em categorias, a falta de habilidade para a análise da densidade ou da forma das caudas dos cometas que podem ser curtas, porém densas ou longas porém dispersas, dependendo do efeito do composto testado, é uma limitação para este tipo de categorização. Com isso, o método de avaliação por software torna-se recomendado (TICE et al., 2000). A verificação da porcentagem de DNA na cauda dos nucleóides (%DNA) é um dos parâmetros confiáveis de análise e muito utilizado (LOU et al., 2009; HANSEN et al., 2009; KUPPAN et al., 2009; BUTTON et al., 2009), embora existam outros parâmetros para a verificação.

Os resultados obtidos por meio da análise das imagens dos nucleóides mostram que no

fígado, o índice de fragmentação observado no grupo Controle Negativo pode ser considerado basal. Kim et al. (2009), relataram resultados semelhantes em fígado de ratos machos. O grupo Controle Solvente e os grupos tratados com as duas doses do beta-caroteno puro (BC 2,5mg e BC 5mg) não demonstraram genotoxicidade no fígado, o que não foi observado nos resultados do teste do micronúcleo em sangue periférico e medula óssea, no grupo tratado com a mesma dose (BC 5mg).

Nos rins, foi observada alta fragmentação do DNA dos animais do grupo Controle Negativo. Normalmente, células renais apresentam maior fragmentação do DNA quando comparadas às células hepáticas, no ensaio do cometa. Este resultado já foi descrito por alguns autores em pesquisas com roedores (OSHIDA et al., 2008; HIGASHIMOTO et al., 2009; CEDERBERG; HENRIKSSON; BINDERUP, 2009; RIBEIRO; CAMPOS; BERGAMASCHI, 2009). Células renais normalmente apresentam alto índice de dano ao DNA *in vivo* (DMITRIEVA; CAI; BURG, 2004). Este dano aparentemente resulta das altas concentrações de NaCl e uréia normalmente presentes no rim, mas é reparado assim que as concentrações destas duas substâncias diminuem por meio do efeito do diurético furosemida (ZHANG et. al., 2004). No entanto, ainda não é bem claro como as células sobrevivem e funcionam normalmente apesar destes danos. Zhang et al. (2004) observaram que altas concentrações de NaCl e uréia aumentam a quantidade de espécies reativas de oxigênio em células renais, o que poderia aumentar o dano ao DNA. Estes resultados poderiam ajudar a explicar porque o tratamento com as duas doses do beta-caroteno puro (BC 2,5mg e BC 5mg), no teste do cometa, diminui a fragmentação do DNA a níveis inferiores ao Controle Negativo. O beta-caroteno, neste caso, poderia agir como antioxidante inativando as espécies reativas de oxigênio.

Embora não tenha sido observada diferença estatística entre os danos apresentados pelo grupo DXR e o Controle Negativo nos rins, a dose de doxorubicina de 16mg/kg já se

mostrou eficiente em induzir danos ao DNA, como foi observado nos outros tecidos analisados nesta pesquisa e também em outros estudos (FERREIRA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2010). A administração de uma dose maior de doxorrubicina torna-se irrelevante, pois não corresponderia a um tratamento clínico, haja vista que este fármaco não deve ser administrado em altas doses devido ao seu potencial cardiotoxico e também aos efeitos colaterais observados nos pacientes.

Na associação do beta-caroteno puro com a doxorrubicina, podemos observar que os grupos Solvente+DXR, BC 2,5mg+DXR e BC 5mg+DXR apresentaram menor fragmentação do DNA tanto no fígado quanto nos rins. Porém, este efeito protetor não pode ser atribuído ao beta-caroteno, pois o óleo de milho *per si* foi capaz de proteger contra os danos induzidos pela doxorrubicina.

Nos animais tratados com o beta-caroteno microencapsulado, podemos observar que as Microcápsulas e as doses BCM 2,5mg e BCM 5mg não foram genotóxicas em ambos os tecidos, assim como os resultados obtidos com o teste do micronúcleo.

No fígado, a associação Microcápsulas+DXR apresentou proteção sobre a genotoxicidade induzida pela doxorrubicina. O material utilizado para o microencapsulamento foi a goma arábica. Apesar desta substância ser muito utilizada no processamento de alimentos, por não afetar significativamente as propriedades do alimento, existem alguns trabalhos que evidenciam a capacidade antioxidante deste composto. Portanto, essa propriedade antioxidante da goma arábica poderia explicar os resultados encontrados no grupo Microcápsulas+DXR. Montenegro et al. (2007), pesquisando a capacidade protetora de licopeno microencapsulado contra a degradação de vitaminas A e D de leite estocado sob luz fluorescente, descobriram que a adição das microcápsulas reduziu em 45% a velocidade de degradação dessas vitaminas. No entanto, concluíram que o mecanismo de fotoproteção foi devido principalmente à capacidade da porção protéica da goma arábica em inativar o estado

tripleto da riboflavina do leite. Estes resultados, nestas condições experimentais, mostram a capacidade antioxidante de microcápsulas produzidas com goma arábica e sugerem que este material utilizado como matriz encapsulante não afetaria a propriedade antioxidante do licopeno. O conceito de ação antioxidante da goma arábica tem levado à publicação de vários artigos indicando, por exemplo, as propriedades protetoras da goma arábica sobre a nefrotoxicidade da gentamicina e da cisplatina em ratos (AL-MAJED et al., 2002; AL-MAJED et al., 2003;), contra a cardiotoxicidade induzida pela doxorrubicina em camundongos (ABD-ALLAH et al., 2002) e contra a hepatotoxicidade do paracetamol também em camundongos (GAMAL EL-DIN et al., 2003). Todos estes estudos foram fundamentados no conceito de que a goma arábica tem um intenso potencial antioxidante e o principal mecanismo de toxicidade dos fármacos estudados seria a geração de radicais livres (ALI; AL MOUNDHRI, 2006). Por outro lado, estudo feito por Ali (2004) sobre os efeitos antioxidantes da goma arábica administrada oralmente em ratos durante oito dias, descobriu que esta substância não alterou os valores de glutathione, ácido ascórbico, peroxidação lipídica e superóxido dismutase nos rins dos animais.

No fígado, os resultados encontrados nos grupos BCM 2,5mg+DXR e BCM 5mg+DXR mostram que as duas doses do beta-caroteno microencapsulado foram antígeno-tóxicas, sendo que a dose de 5mg/kg foi mais efetiva na proteção, complementando os resultados obtidos com o teste do micronúcleo em medula óssea e sangue periférico.

No rim, com os resultados opostos entre as duas doses associadas à doxorrubicina (BCM 2,5mg+DXR e BCM 5mg+DXR), a menor apresentando genotoxicidade e a maior sendo antígeno-tóxica, pode-se sugerir que, como foi observado no teste do micronúcleo, devido ao microencapsulamento, o beta-caroteno apresentou ação antígeno-tóxica apenas quando foi utilizado em maior dose.

A diferença de resposta entre as doses do beta-caroteno puro e microencapsulado,

quando associados à doxorubicina, também pode estar relacionada à sua melhor absorção na presença de lipídios. Os carotenóides são hidrofóbicos e sua absorção depende, não só apenas de como são liberados da matriz alimentar, mas também da subsequente solubilização pelos ácidos biliares e enzimas digestivas, resultando na sua incorporação pelas micelas. Por esta razão, a presença de lipídios na dieta tem sido considerada um importante co-fator na biodisponibilidade de carotenóides (PARADA; AGUILERA, 2007). Com isso, a utilização do óleo de milho como solvente na administração do beta-caroteno puro poderia intensificar sua absorção, o que não aconteceria com o beta-caroteno microencapsulado.

A diferença de resposta entre as doses do beta-caroteno puro e o microencapsulado evidencia a necessidade de se realizar a dosagem do carotenóide no plasma dos animais. Com isto, pode-se fazer uma comparação entre a biodisponibilidade do composto puro e o microencapsulado. Esta dosagem está em andamento no Laboratório de Química Orgânica do Departamento de Física e Química da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto-USP.





## CONCLUSÕES

Foi realizada, neste estudo, a comparação da ação mutagênica/antimutagênica entre duas doses do beta-caroteno puro ou na forma microencapsulada em células da medula óssea, rins, fígado e reticulócitos de ratos Wistar tratados com o antitumoral doxorrubicina.

Conforme os resultados obtidos com o teste do micronúcleo, pode-se concluir que:

- A dose de 2,5mg/kg do beta-caroteno puro não foi mutagênica, pois não induziu a formação de micronúcleos;
- A dose de 5mg/kg do beta-caroteno puro foi mutagênica, pois induziu a formação de micronúcleos;
- Quando associados à doxorrubicina, o beta-caroteno puro foi capaz de proteger contra a mutagenicidade da doxorrubicina apenas na dose 2.5mg/kg;
- As duas doses do beta-caroteno microencapsulado não foram mutagênicas nem antimutagênicas;

Conforme os resultados obtidos com o ensaio do cometa, pode-se concluir que:

- As duas doses, tanto do beta-caroteno puro quanto do microencapsulado, no fígado e nos rins, não foram genotóxicas;
- No tratamento com o beta-caroteno puro, associado à doxorrubicina, houve redução na formação de micronúcleos, no fígado e nos rins, porém esta proteção não pode ser atribuída exclusivamente ao beta-caroteno puro, pois a redução dos danos foi semelhante ao tratamento com o Controle Solvente (óleo de milho);
- No tratamento com o beta-caroteno microencapsulado, associado a doxorrubicina, as duas doses foram antigenotóxicas no fígado, enquanto nos

rins apenas a dose 5mg/kg foi considerada antigenotóxica.

- Na comparação entre os resultados obtidos com o teste o micronúcleo e ensaio do cometa, foi possível concluir que apesar dos danos observados no ensaio do cometa serem passíveis de reparo, alguns danos podem não ser reparados, dependendo do tratamento, levando à formação de micronúcleos.

Em conclusão, o beta-caroteno puro não deve ser utilizado em altas doses, pois aumenta o dano ao DNA e quando microencapsulado não perde suas propriedades, porém uma dose maior deve ser utilizada para que o carotenóide tenha efeito antimutagênico.



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD-ALLAH, A.R.; AL-MAJED, A.A.; MOSTAFA, A.M.; AL-SHABANAH, O.A.; DIN, A.G.; NAGI, M.N. Protective effect of arabic gum against cardiotoxicity induced by doxorubicin in mice: a possible mechanism of protection. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, New York, v.16 n.5, p.254-259, 2002.

ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; ZETTERBERG, G.; BERGQVIST, M.; GRAWÉ, J. Human cytogenetic biomonitoring using flow-cytometric analysis of micronuclei in transferrin-positive immature peripheral blood reticulocytes. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.36, n.1, p.22-31, 2000.

ALI, B.H. Does gum Arabic have an antioxidant action in rat kidney? **Renal failure**, New York, v.26, n.1, p.1-3, 2004.

ALI, B.H.; AL MOUNDHRI, M.S. Agents ameliorating or augmenting the nephrotoxicity of cisplatin and other platinum compounds: a review of some recent research. **Food and chemical toxicology**, New York, v.44, n.8, p.1173-1183, 2006.

ALIJA, A.J; BRESGEN, N.; SOMMERBURG, O.; SIEMS, W.; ECKL, P.M. Cytotoxic and genotoxic effects of beta-carotene breakdown products on primary rat hepatocytes. **Carcinogenesis**, New York, v.25, n.5, p.827-831, 2004.

AL-MAJED, A.A.; ABD-ALLAH, A.R.; AL-RIKABI, A.C.; AL-SHABANAH, O.A.; MOSTAFA, A.M. Effect of oral administration of Arabic gum on cisplatin-induced nephrotoxicity in rats. **Journal of biochemical and molecular toxicology**, New York, v.17, n.3, p.146-153, 2003.

AL-MAJED, A.A.; MOSTAFA, A.M.; AL-RIKABI, A.C.; AL-SHABANAH, O.A. Protective effects of oral arabic gum administration on gentamicin-induced nephrotoxicity in rats. **Pharmacological research**, London, v.46, n.5, p.445-451, 2002.

ANTUNES, L.M.; DARIN, J.D.; BIANCHI, M.D. Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study. **Pharmacological research**, London, v.41, n.4, p.405-411, 2000.

ANTUNES, L.M.; 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**, Amsterdam, v.419, p.1-3, p.137-143, 1998.

ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. **Revista de Nutrição**, Campinas, v.13, n.2, p.81-88, 2000.

ANTUNES, L.M.G.; PASCOAL, L.M.; BIANCHI, M.L.P.; DIAS, F.L. Evaluation of the clastogenicity and anticlastogenicity of the carotenoid bixin in human lymphocyte cultures. **Mutation research**, Amsterdam, v.585, p.113-119, 2005.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. CNNPA - Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 44 de 1977. Considera corante a substância ou a mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento(e bebida). D.O.U. - **Diário Oficial da União**; Poder Executivo, de 01 de fevereiro de 1978.

APARECIDA RESENDE, F.; DE ANDRADE BARCALA, C.A.; DA SILVA FARIA, M.C.; KATO, F.H.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life sciences**, Elmsford, v.79, n.13, p.1268-1273, 2006.

ARAB, L.; STECK-SCOTT, S.; BOWEN, P. Participation of lycopene and beta-carotene in carcinogenesis: defenders, aggressors, or passive bystanders? **Epidemiologic reviews**, Baltimore, v.23, n.2, p.211-230, 2001.

ASTORG, P.; GRADELET, S.; BERGÈS, R.; SUSCHETET, M. Dietary lycopene decreases the initiation of liver preneoplastic foci by diethylnitrosamine in the rat. **Nutrition and cancer**, Philadelphia, v.29, n.1, p.60-68, 1997.

ATBC - The Alpha-Tocopherol, Beta-Carotene Cancer Prevention Study Group. The effect of vitamin E and beta-carotene on the incidence of lung cancer and other cancers in male smokers. **The New England journal of medicine**, Boston, v.330, p.1029-1035, 1994.

AUGUSTIN, M.A.; HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society reviews**, London, v. 38, n.4, p.902-912, 2009.

BALSANO, C.; ALISI, A. Antioxidant effects of natural bioactive compounds. *Current pharmaceutical design*, Schiphol, v.15, n.26, p.3063-3073, 2009.

BARBOSA, M.I.J.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Light stability of spray-dried encapsulated bixin with different edible polysaccharides preparations. **Food research international**, Ottawa, v.38, p.989-994, 2005.

BARCELOS, G.R.; ANGELI, J.P.; SERPELONI, J.M.; ROCHA, B.A.; MANTOVANI, M.S.; ANTUNES, L.M. Effect of annatto on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.50, n.9, p.808-814, 2009.

BELOGOLOVSKAYA, E.G.; ORESHCHENKO, A.V.; DURNEV, A.D.; SEREDENIN, S.B.; LITVINOVA, E.V.; ZUBTSOV, Y.N. Effects of beta-carotene and aspartame on clustrogenic activity of cyclophosphamide and dioxidine in mice. **Bulletin of experimental biology and medicine**, New York, v.130, n.11, p.1102-1205, 2000.

BRASIL. RESOLUÇÃO-RDC Nº 41, DE 10 DE AGOSTO DE 2009. "Regulamento Técnico sobre Atribuição de Aditivos e seus Limites Máximos para a Subcategoria 16.1.1 Bebidas Alcoólicas". Diário Oficial da União, Brasília, DF, 11 ago. 2009. Seção 1, p. 39.

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

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

BUTTON, M.; JENKIN, G.R.; BOWMAN, K.J.; HARRINGTON, C.F.; BREWER, T.S.; JONES, G.D.; WATTS, M.J. DNA damage in earthworms from highly contaminated soils: Assessing resistance to arsenic toxicity by use of the Comet assay. **Mutation research**, Amsterdam, 2009. In Press. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.009>. Acesso em 14/01/2010.

CALABRESE, V.; BATES, T.E.; MANCUSO, C.; CORNELIUS, C.; VENTIMIGLIA, B.; CAMBRIA, M.T.; DI RENZO, L.; DE LORENZO, A.; DINKOVA-KOSTOVA, A.T. Curcumin and the cellular stress response in free radical-related diseases. **Molecular nutrition & food research**, Weinheim, v.52, n.9, p.1062-1073, 2008.

CALVO, M.M.; SANTA-MARÍA, G. Effect of illumination and chlorophylls on stability of tomato carotenoids, **Food chemistry**, Barking, v.107, p.1365–1370, 2008.

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

CEDERBERG, H.; HENRIKSSON, J.; BINDERUP, M.L. DNA damage detected by the alkaline comet assay in the liver of mice after oral administration of tetrachloroethylene. **Mutagenesis**, Washington, 2009. In Press. Disponível em <<http://mutage.oxfordjournals.org/cgi/content/full/gep051v1>>. Acesso em 14/01/2010.

CELIK, A.; OGENLER, O.; CÖMELEKOGLU, U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate. **Mutagenesis**, Washington, v.20, n.6, p.411-415, 2005.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current opinion in biotechnology**, London, v.18, n.2, p.184-190, 2007.

CHRISTIANSEN, S.; AUTSCHBACH, R. Doxorubicin in experimental and clinical heart failure. **European journal of cardio-thoracic surgery**, Berlin, v.30, p.611-616, 2006.

CIACCIO, M.; VALENZA, M.; TESORIERE, L.; BONGIORNO, A.; ALBIERO, R.; LIVREA, M.A. Vitamin A inhibits doxorubicin-induced membrane lipid peroxidation in rat tissues *in vivo*. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v.302, n.1, p.103-108, 1993.

COMSTOCK, G.W.; ALBERG, A.J.; HUANG, H.Y.; WU, K.; BURKE, A.E.; HOFFMAN, S.C.; NORKUS, E.P.; GROSS, M.; CUTLER, R.G.; MORRIS, J.S.; SPATE, V.L.; HELZLSOUER, K.J. The risk of developing lung cancer associated with antioxidants in the blood: ascorbic acids, carotenoids, alpha-tocopherol, selenium, and total peroxy radical absorbing capacity. **American journal of epidemiology**, Baltimore, v.168, n.7, p.831-840, 2008.

DAVIES, B.H. Carotenoids. In: Chemistry and biochemistry of plant pigments, vol.2. T.W. Goodwin (Ed.). **Academic press**, London, p.38-165, 1976.

DE BEER, E.L.; BOTTONE, A.E.; VOEST, E.E. Doxorubicin and mechanical performance of cardiac trabeculae after acute and chronic treatment: a review. **European journal of pharmacology**, Amsterdam, v.415, n.1, p.1-11, 2001.

DE JONGE, M.J.; VERWEIJ, J. Renal toxicities of chemotherapy. **Seminars in oncology**, Philadelphia, v.33, n.1, p.68-73, 2006.

DE VOS, W.M. ; CASTENMILLER, J.J. ; HAMER, R.J. ; BRUMMER, R.J. Nutridynamics-studying the dynamics of food components in products and in the consumer. **Current opinion in biotechnology**, London, v.17, n.2, p.217-225, 2006.

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

DELMANTO, R.D.; DE LIMA, P.L.; SUGUI, M.M.; DA EIRA, A.F.; SALVADORI, D.M.; SPEIT, G.; RIBEIRO, L.R. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the

genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation research**, Amsterdam, v.496, n1-2, p.15-21, 2001.

DERTINGER, S.D.; CHEN, Y.; MILLER, R.K.; BREWER, K.J.; SMUDZIN, T.; TOROUS, D.K.; HALL, N.E.; OLVANY, K.A.; MURANTE, F.G.; TOMETSKO, C.R. Micronucleated CD71-positive reticulocytes: a blood-based endpoint of cytogenetic damage in humans. **Mutation research**, Amsterdam, v.542, n.1-2, p.77-87, 2003.

DESOBRY, S.A, NETTO, F.M.; LABUZA, T.P.: Comparison of spray-drying, drum-drying and freeze-drying for  $\beta$ -carotene encapsulation and preservation. **Journal of food science**, Champaign, v.62, n.6, p.1158–1162, 1997.

DESOBRY, S.A.; NETTO, F.M.; LABUZA, T.P. Influence of Maltodextrin Systems at an Equivalent 25DE on Encapsulated  $\beta$ -carotene Loss During Storage. **Journal of food processing preservation**, Malden, v.23, p.39-55, 1999.

DHAWAN, A.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D. Comet assay: a reliable tool for the assessment of DNA damage in different models. **Cell biology and toxicology**, Princeton, v.25, n.1, p.5-32, 2009.

DMITRIEVA, N.I.; CAI, Q.; BURG, M.B. Cells adapted to high NaCl have many DNA breaks and impaired DNA repair both in cell culture and in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, n.8, p.2317-2322, 2004.

DURNEV, A.D.; TIURINA, L.S.; GUSEVA, N.V.; ORESHCHENKO, A.V.; SEREDENIN, S.B. Mutagen-modifying effects of beta-carotene *in vivo*. **Genetika**, Moskva, v.33(5), p.717-720, 1997.

EDGE, R.; MCGARVEY, D.J.; TRUSCOTT, T.G. The carotenoids as anti-oxidants--a review. **Journal of photochemistry and photobiology. B, Biology**, Lausanne, v.41, n.3, p.189-200, 1997.

ELIOT, H.; GIANNI, L.; MYERS, C. Oxidative destruction of DNA by the adriamycin-iron complex. **Biochemistry**, Washington, v.23, p.928-936, 1984.

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

FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Food Standards Programme. Codex Committee on Food Additives and Contaminants. Action Required as a Result of Changes in Acceptable Daily Intake (ADI)



Status and Other Toxicological Recommendations. Rotterdam, The Netherlands, 11-15 March 2002.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods in molecular medicine**, Totowa, v.111, p.3-32, 2005.

FERREIRA, A.L.; SALVADORI, D.M.F.; NASCIMENTO, M.C.; ROCHA, N.S.; CORREA, C.R.; PEREIRA, E.J.; MATSUBARA, L.S.; MATSUBARA, B.B.; LADEIRA, M.S. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. **Mutation research**, Amsterdam, v.631, n.1, p.26-35, 2007.

FOOTE, C.S.; DENNY, R.W. Chemistry of singlet oxygen VII. Quenching by  $\beta$ -carotene. **Journal of the American Chemical Society**, Easton, v.90, p.6233-6235, 1968.

FURTADO, R.A.; DE ARAÚJO, F.R.; RESENDE, F.A.; CUNHA, W.R.; TAVARES, D.C. Protective effect of rosmarinic acid on V79 cells evaluated by the micronucleus and comet assays. **Journal of applied toxicology**, Philadelphia, 2009. Disponível em <http://www3.interscience.wiley.com/cgi-bin/fulltext/122652792/PDFSTART>. Acesso em 14/01/2010.

GAMAL EL-DIN, A.M.; MOSTAFA, A.M.; AL-SHABANAH, O.A.; AL-BEKAIRI, A.M.; NAGI, M.N. Protective effect of arabic gum against acetaminophen-induced hepatotoxicity in mice. **Pharmacological research**, London, v.48, n.6, p.631-635, 2003.

GIANNI, L.; ZWEIER, J.L.; LEVY, A.; MYERS, C.E. Characterization of the cycle of iron-mediated electron transfer from Adriamycin to molecular oxygen. **The Journal of biological chemistry**, Baltimore, v.260, n.11, p.6820-6, 1985.

GLEI, M.; LIEGIBEL, U.M.; EBERT, M.N.; BÖHM, V.; POOL-ZOBEL, B.L. Beta-Carotene reduces bleomycin-induced genetic damage in human lymphocytes. **Toxicology and applied pharmacology**, New York, v.179, n.2, p.65-73, 2002.

GOLLAPUDI, B.B.; MCFADDEN, L.G. Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v.347, n.2, p.97-99, 1995.

GRODSTEIN, F.; KANG, J.H.; GLYNN, R.J.; COOK, N.R.; GAZIANO, J.M. A randomized trial of beta carotene supplementation and cognitive function in men: the Physicians' Health Study II. **Archives of internal medicine**, Chicago, v.167, n.20, p.2184-2190, 2007.

Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. Institute of Laboratory Animal Resources. Commission on Life Sciences. National Research Council. **National Academy Press**.

Washington, 1996. Disponível em [http://www.nap.edu/openbook.php?record\\_id=5140&page=R1](http://www.nap.edu/openbook.php?record_id=5140&page=R1). Acesso em 14/01/2010.

HAMADA, S.; YAMASAKI, K.I.; NAKANISHI, S.; OMORI, T.; SERIKAWA, T.; HAYASHI, M. Evaluation of the general suitability of the rat for the micronucleus assay: the effect of cyclophosphamide in 14 strains. **Mutation research**, Amsterdam, v.495, n.1-2, p.127-134, 2001.

HANSEN, S.H.; OLSEN, A.K.; SØDERLUND, E.J.; BRUNBORG, G. In vitro investigations of glycidamide-induced DNA lesions in mouse male germ cells and in mouse and human lymphocytes. **Mutation research**, Amsterdam, 2009. In Press. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.012>. Acesso em 14/01/2010.

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

HAYASHI, M.; KODAMA, Y.; AWOGI, T.; SUZUKI, T.; ASITA, A.O.; SOFUNI, T. The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation research**, Amsterdam, v.278, n.2-3, p.209-213, 1992.

HAYASHI, M.; MACGREGOR, J.T.; GATEHOUSE, D.G.; BLAKEY, D.H.; DERTINGER, S.D.; ABRAMSSON-ZETTERBERG, L.; KRISHNA, G.; MORITA, T.; RUSSO, A.; ASANO, N.; SUZUKI, H.; OHYAMA, W.; GIBSON, D. In Vivo Micronucleus Assay Working Group, IWGT. In vivo erythrocyte micronucleus assay III. Validation and regulatory acceptance of automated scoring and the use of rat peripheral blood reticulocytes, with discussion of non-hematopoietic target cells and a single dose-level limit test. **Mutation research**, Amsterdam, v.627, n.1, p.10-30, 2007.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M.JR. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. **Mutation research**, Amsterdam, v.245, n.4, p.245-259, 1990.

HAYASHI, M.; SOFUNI, T.; ISHIDATE, M. JR. An application of acridine orange fluorescent staining to the micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v.120, n.4, p.241-247, 1983.

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

HENNEKENS, C.H.; BURING, J.E.; MANSON, J.E.; STAMPFER, M.; ROSNER, B.; COOK, N. E.; BELANGER, C.; LAMOTTE, F.; GAZIANO, J. M. RIDKER, P. M.; WILLETT, W.; PETO, R. Lack of effect of long-term supplementation with beta carotene on the incidence of malignant neoplasms and cardiovascular disease. **The New England Journal of Medicine**, Boston, v.334, p.1145–1149, 1996.

HIGASHIMOTO, M.; ISOYAMA, N.; ISHIBASHI, S.; INOUE, M.; TAKIGUCHI, M.; SUZUKI, S.; OHNISHI, Y.; SATO, M. Tissue-dependent preventive effect of metallothionein against DNA damage in dyslipidemic mice under repeated stresses of fasting or restraint. **Life sciences**, Elmsford, v.84, n.17-18, p.569-575, 2009.

INJAC, R.; BOSKOVIC, M.; PERSE, M.; KOPRIVEC-FURLAN, E.; CERAR, A.; DJORDJEVIC, A.; STRUKELJ, B. Acute doxorubicin nephrotoxicity in rats with malignant neoplasm can be successfully treated with fullereneol C60(OH)<sub>24</sub> via suppression of oxidative stress. **Pharmacological reports: PR.**, Kraków, v.60, n.5, p.742-749, 2008.

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

Internacional Agency for Research on Cancer (IARC). IARC handbooks of cancer prevention: carotenoids. Vol 2. **Oxford, United Kingdom: Oxford University Press**, 1998:39.

IUPAC Commission on the Nomenclature of Organic Chemistry (CNOC) and IUPAC-IUB Commission on Biochemical Nomenclature (CBN). Nomenclature of Carotenoids. *Molecular and Cellular Biochemistry*. Volume 9, Number 2 / November, 1975.

KEIJER, J.; BUNSCHOTEN, A.; PALOU, A.; FRANSSEN-VAN HAL, N.L. Beta-carotene and the application of transcriptomics in risk-benefit evaluation of natural dietary components. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v.30;1740(2) p.139-146, 2005.

KIM, M.Y.; CHEONG, S.H.; KIM, M.H.; SON, C.; YOON, H.S.; SOK, D.E.; KIM, J.H.; CHO, Y.; CHUN, H.; KIM, M.R. Leafy vegetable mix supplementation improves lipid profiles and antioxidant status in C57BL/6J mice fed a high fat and high cholesterol diet. **Journal of medicinal food**, Larchmont, v.12, n.4, p.877-84, 2009.

KIRKLAND, D.; AARDEMA, M.; HENDERSON, L, MÜLLER, L. Evaluation of the ability of a battery of three in vitro genotoxicity tests to discriminate rodent carcinogens and non-carcinogens: I. Sensitivity, specificity and relative predictivity. **Mutation research**, Amsterdam, v.584, n.1-2, p.1-256, 2005.

KIRKLAND, D.; PFUHLER, S.; TWEATS, D.; AARDEMA, M.; CORVI, R.; DARROUDI, F.; ELHAJOUJI, A.; GLATT, H.; HASTWELL, P.; HAYASHI, M.; KASPER, P.; KIRCHNER, S.; LYNCH, A.; MARZIN, D.; MAURICI, D.; MEUNIER, J.R.; MÜLLER, L.;

NOHYNEK, G.; PARRY, J.; PARRY, E.; THYBAUD, V.; TICE, R.; VAN BENTHEM, J.; VANPARYS, P.; WHITE, P. How to reduce false positive results when undertaking in vitro genotoxicity testing and thus avoid unnecessary follow-up animal tests: Report of an ECVAM Workshop. **Mutation research**, Amsterdam, v.628, n.1, p.31-55, 2007.

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

KUMAR, P.; KALONIA, H.; KUMAR, A. Lycopene modulates nitric oxide pathways against 3-nitropropionic acid-induced neurotoxicity. **Life sciences**, Elmsford, v.85, n.19-20, p.711-718, 2009.

KUPPAN, G.; BALASUBRAMANYAM, J.; MONICKARAJ, F.; SRINIVASAN, G.; MOHAN, V.; BALASUBRAMANYAM, M. Transcriptional regulation of cytokines and oxidative stress by gallic acid in human THP-1 monocytes. **Cytokine**, San Diego, 2009. In Press. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.cyto.2009.11.003>. Acesso em 14/01/2010.

LAMBERT, J.M.; WEINBRECK, F.; KLEEREBEZEM, M. In vitro analysis of protection of the enzyme bile salt hydrolase against enteric conditions by whey protein-gum arabic microencapsulation. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.56, n.18, p.8360-8364, 2008.

LEO, M.A.; LIEBER, C.S. Alcohol, vitamin A, and beta-carotene: adverse interactions, including hepatotoxicity and carcinogenicity. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v.69, n.6, p.1071-1085, 1999.

LIEBLER, D.C. Antioxidant reactions of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.691, p.20-31, 1993.

LINGYUN, C.; GABRIEL, E.R.; MURIEL, S. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, Cambridge, v. 17, n.5, p. 272-283, 2006.

LIU, C.; WANG, X.D.; BRONSON, R.T.; SMITH, D.E.; KRINSKY, N.I.; RUSSELL, R.M. Effects of physiological versus pharmacological beta-carotene supplementation on cell proliferation and histopathological changes in the lungs of cigarette smoke-exposed ferrets. **Carcinogenesis**, New York, v.21, n.12, p.:2245-2253, 2000.

LIU, L.F. DNA topoisomerase poisons as antitumor drugs. **Annual review of biochemistry**, Palo Alto, v.58, p.351-75, 1989.

LOU, J.; ZHOU, G.; CHU, G.; JIANG, J.; HUANG, F.; ZHENG, S.; LU, Y.; LI, X.; HE, J. Studying the cyto-genotoxic effects of 12 cigarette smoke condensates on human

lymphoblastoid cell line in vitro. **Mutation research**, Amsterdam, 2009. In Press. Disponível em <http://dx.doi.org/10.1016/j.mrgentox.2009.12.011>. Acesso em 14/01/2010.

MACGREGOR, J.T.; HEDDLE, J.A.; HITE, M.; MARGOLIN, B.H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M.F.; TICE, R.R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation research**, Amsterdam, v.189, n.2, p.103-12, 1987.

MACGREGOR, J.T.; WEHR, C.M.; GOULD, D.H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: the basis of an improved micronucleus test. **Environmental Mutagenesis**, New York, v.2, n.4, p.509-514, 1980.

MANCA, D.; ROVAGLIO, M. Modeling the controlled release of microencapsulated drugs: theory and experimental validation. **Chemical Engineering Science**, Oxford, v. 58, v.7, p. 1337-1351, 2003.

MANGELS, A.R.; HOLDEN, J.M.; BEECHER, G.R.; FORMAN, M.R.; LANZA, E. Carotenoid content of fruits and vegetables: an evaluation of analytic data. **Journal of the American Dietetic Association**, Chicago, v.93, n.3, p.284-296, 1993.

MAPARI, S.A.; MEYER, A.S.; THRANE, U. Photostability of natural orange-red and yellow fungal pigments in liquid food model systems. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.57, n.14, p.6253-6261, 2009.

MAYNE, S.T.; HANDELMAN, G.J.; BEECHER, G. Beta-Carotene and lung cancer promotion in heavy smokers--a plausible relationship? **Journal of the National Cancer Institute**, Bethesda, v.88, n.21, p.1513-1515, 1996.

MEDOLA, J.F.; CINTRA, V.P.; PESQUEIRA, E. SILVA E.P.; DE ANDRADE, ROYO V.; DA SILVA, R.; SARAIVA, J.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K.; ANDRADE, E. SILVA M.L.; TAVARES, D.C. (-)-Hinokinin causes antigenotoxicity but not genotoxicity in peripheral blood of Wistar rats. **Food and chemical toxicology**, New York, v.45, n.4, p.638-642, 2007.

MENG, Z.; QIN, G.; ZHANG, B. DNA damage in mice treated with sulfur dioxide by inhalation. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.46, n.3, p.150-155. 2005.

MONTENEGRO, M.A.; NUNES, I.L.; MERCADANTE, A.Z.; BORSARELLI, C.D. Photoprotection of Vitamins in Skimmed Milk by an Aqueous Soluble Lycopene-Gum Arabic Microcapsule. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.55, n.2, p.323-329, 2007.

MONTILLA, P.L.; TÚNEZ, I.F.; MUÑOZ, DE AGUEDA. C.; GASCÓN, F.L.; SORIA, J.V. Protective role of melatonin and retinol palmitate in oxidative stress and hyperlipidemic nephropathy induced by adriamycin in rats. **Journal of Pineal Research**, New York, v.25, n.2, p.86-93, 1998.

MUKHERJEE, A.; AGARWAL, K.; AGUILAR, M.A.; SHARMA, A. Anticlastogenic activity of beta-carotene against cyclophosphamide in mice *in vivo*. **Mutation research**, Amsterdam, v.263(1), p.41-46, 1991.

NUNES, I. L.; MERCADANTE, A. Z. Encapsulation of lycopene using spray-drying and molecular inclusion processes. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, Curitiba, v.50, p893-900, 2007.

OBERMUELLER-JEVIC, U.C.; ESPIRITU, I.; CORBACHO, A.M.; CROSS, C.E.; WITSCHI, H. Lung tumor development in mice exposed to tobacco smoke and fed beta-carotene diets. **Toxicological Sciences**, Orlando, v.69(1), p.23-29, 2002.

OMENN, G.S.; GOODMAN, G.E.; THORNQUIST, M.D.; BALMES, J.; CULLEN, M.R., GLASS, A.; KEOGH, J.P.; MEYSKENS, F.L.; VALANIS, B.; WILLIAMS, J.H.; BARNHART, S.; HAMMAR, S. Effects of a combination of beta carotene and vitamin A on lung cancer and cardiovascular disease. **The New England journal of medicine**, Boston, v.334, n.18, p.1150-1155, 1996.

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

PAIVA, S.A.; RUSSELL, R.M. Beta-carotene and other carotenoids as antioxidants. **Journal of the American College of Nutrition**, New York, v.18, p.5, p.426-433, 1999.

PALOZZA, P.; SERINI, S.; TORSELLO, A.; DI NICUOLO, F.; PICCIONI, E.; UBALDI, V.; PIOLI, C.; WOLF, F.I.; CALVIELLO, G. Beta-carotene regulates NF-kappaB DNA-binding activity by a redox mechanism in human leukemia and colon adenocarcinoma cells. **The Journal of nutrition**, Philadelphia, v.133, n.2, p.381-388, 2003.

PAOLINI, M.; ANTELLI, A.; POZZETTI, L.; SPETLOVA, D.; PEROCCO, P.; VALGIMIGLI, L.; PEDULLI, G.F.; CANTELLI-FORTI, G. Induction of cytochrome P450 enzymes and over-generation of oxygen radicals in beta-carotene supplemented rats. **Carcinogenesis**, New York, v.22, n.9, p.1483-1495, 2001.

PARADA, J.; AGUILERA, J.M. Food microstructure affects the bioavailability of several nutrients. **Journal of food science**, Champaign, v.72, n.2, p.R21-32, 2007.

PATEL, R.K.; TRIVEDI, A.H.; JAJU, R.J.; KUKRETI, M.S.; BHATAVDEKAR, J.M.; SHAH, P.M.; PATEL, D.D. Protection from pan masala induced genomic damage by beta-carotene and retinoic acid--an in vitro experience. **Neoplasma**, Bratislava, v.45, n.3, p.169-175, 1998.

PATEL, S.; PANDEY, A.K.; BAJPAYEE, M.; PARMAR, D.; DHAWAN, A. Cypermethrin-induced DNA damage in organs and tissues of the mouse: evidence from the comet assay. **Mutation research**, Amsterdam, v.607, n.2, p.176-183, 2006.

PEREVERZEVA, E.; TRESCHALIN, I.; BODYAGIN, D.; MAKSIMENKO, O.; KREUTER, J.; GELPERINA, S. Intravenous tolerance of a nanoparticle-based formulation of doxorubicin in healthy rats. **Toxicology letters**, Amsterdam, v.178, n.1, p.9-19, 2008.

PERSSON, C.; SASAZUKI, S.; INOUE, M.; KURAHASHI, N.; IWASAKI, M.; MIURA, T.; YE, W.; TSUGANE, S.; JPHC STUDY GROUP. Plasma levels of carotenoids, retinol and tocopherol and the risk of gastric cancer in Japan: a nested case-control study. **Carcinogenesis**, New York, v.29, n.5, p.1042-1048, 2008

PETO, R.; DOLL, R.; SPORN, M.B. Can dietary  $\beta$ -carotene materially reduce human cancer rates?, **Nature**, London, v.290, p.201-208, 1981.

PFUHLER, S.; KIRKLAND, D.; KASPER, P.; HAYASHI, M.; VANPARYS, P.; CARMICHAEL, P.; DERTINGER, S.; EASTMOND, D.; ELHAJOUJI, A.; KRUL, C.; ROTHFUSS, A.; SCHOENING, G.; SMITH, A.; SPEIT, G.; THOMAS, C.; VAN BENTHEM, J.; CORVI, R. Reduction of use of animals in regulatory genotoxicity testing: Identification and implementation opportunities-Report from an ECVAM workshop. **Mutation research**, Amsterdam, v.680, n.1-2, p.31-42, 2009.

POUL, M.; JARRY, G.; ELHKIM, M.O.; POUL, J.M. Lack of genotoxic effect of food dyes amaranth, sunset yellow and tartrazine and their metabolites in the gut micronucleus assay in mice. **Food and chemical toxicology**, Oxford, v.47, n.2, p.443-448, 2009.

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

QUILES, J.L.; HUERTAS, J.R.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; RAMÍREZ-TORTOSA, M.C. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, Amsterdam, v.180, n.1, p.79-95, 2002.

RANDHAWA, S.; BAHNA, S.L. Hypersensitivity reactions to food additives. Current opinion in allergy and clinical immunology, Hagerstown, v.9, n.3, p.278-283, 2009.

RAO, A.V.; RAO, L.G. Carotenoids and human health. **Pharmacological research**, London, v.55(3), p.207-217, 2007.

RAUSCHER, R.; EDENHARDER, R.; PLATT, K.L. In vitro antimutagenic and in vivo anticlastogenic effects of carotenoids and solvent extracts from fruits and vegetables rich in carotenoids. **Mutation research**, Amsterdam, v.413, n.2, p.129-142, 1998.

REDDY, M.K.; ALEXANDER-LINDO, R.L.; NAIR, M.G. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes, and human tumor cell proliferation by natural food colors. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.53, n.23, p.9268-9273, 2005.

RESENDE, F.A.; ALVES, J.M.; MUNARI, C.C.; SENEDESE, J.M.; SOUSA, J.P.; BASTOS, J.K.; TAVARES, D.C. Inhibition of doxorubicin-induced mutagenicity by *Baccharis dracunculifolia*. **Mutation research**, Amsterdam, v.634, n.1-2, p.112-118, 2007.

RIBEIRO, D.A.; CAMPOS, R.R.; BERGAMASCHI, C.T. Chronic renal failure induces genetic instability in multiple organs of Wistar rats. **European journal of clinical investigation**, Berlin, v.39, n.4, p.289-295, 2009.

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

RIBEIRO, L.R. Teste do micronúcleo em células da medula óssea de roedores *in vivo*. **Mutagênese Ambiental**. Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. (Eds). Editora Ulbras, Canoas, p.173-198, 2003.

RICHELLE, M.; BORTLIK, K.; LIARDET, S.; HAGER, C.; LAMBELET, P.; BAUR, M.; APPLGATE, L.A.; OFFORD, E.A. A food-based formulation provides lycopene with the same bioavailability to humans as that from tomato paste. **The Journal of nutrition**, Philadelphia, v.132, n.3, p.404-408, 2002.

RIOS ADE, O.; BORSARELLI, C.D.; MERCADANTE, A.Z. Thermal degradation kinetics of bixin in an aqueous model system. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.53, n.6, p.2307-2311, 2005.

ROBERT, P.; CARLSSON, R.M.; ROMERO, N.; MASSON, L. Stability of spray-dried encapsulated carotenoid pigments from rosa mosqueta (*Rosa rubiginosa*) oleoresin. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, Champaign, v.80, n.16, p.1115-1120, 2003.



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

SALAMONE, M.; HEDDLE, J.; STUART, E.; KATZ, M. Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. **Mutation research**, Amsterdam, v.74, n.5, p.347-356, 1980.

SALVADORI, D.M.F.; RIBEIRO, L.R.; OLIVEIRA, M.D.M.; PEREIRA, C.A.B.; BEÇAK, W. The protective effect of  $\beta$ -carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation research**, Amsterdam, v.265, n.2, p.237-244, 1992.

SASAKI, Y.F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation research**, Amsterdam, v.519, p.1-2, p.103-119, 2002.

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

SCHLEGEL, R.; MACGREGOR, J.T. The persistence of micronucleated erythrocytes in the peripheral circulation of normal and splenectomized Fischer 344 rats: implications for cytogenetic screening. **Mutation research**, Amsterdam, v.127, n.2, p.169-174, 1984.

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

SCHMID, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. **Chemical Mutagens: Principles and Methods for their Detection**, New York, v.4, p.31-53, 1976.

SCHROOYEN, P.M.; VAN DER MEER, R.; DE KRUIF, C.G. Microencapsulation: its application in nutrition. **The Proceedings of the Nutrition Society**, London, v.60, n.4, p.475-479, 2001.

SEKIHASHI, K.; YAMAMOTO, A.; MATSUMURA, Y.; UENO, S.; WATANABE-AKANUMA, M.; KASSIE, F.; KNASMÜLLER, S.; TSUDA, S.; SASAKI, Y.F. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. **Mutation research**, Amsterdam, v.517, n.1-2, p.53-75, 2002.

SELLERS, R.S.; MORTON, D.; MICHAEL, B.; ROOME, N.; JOHNSON, J.K.; YANO, B.L.; PERRY, R.; SCHAFER, K. Society of Toxicologic Pathology position paper: organ weight recommendations for toxicology studies. **Toxicologic pathology**, Newark, v.35, n.5, p.751-755, 2007.

SELVAKUMAR, E.; PRAHALATHAN, C.; SUDHARSAN, P.T.; VARALAKSHMI, P. Protective effect of lipoic acid on micronuclei induction by cyclophosphamide. **Archives of Toxicology**, Berlin, v.80, n.2, p.11511-9, 2006.

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

SHU, B.; YU, W.; ZHAO, Y.; LIU, X. Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, Maledn, v.76, n.4, p.664-669, 2006.

SILVA, C.R.; ANTUNES, L.M.G.; BIANCHI, M.L.P. Antioxidant action of bixin against cisplatin-induced chromosome aberrations and lipid peroxidation in rats. **Pharmacological research**, London, v.43, p.561-566, 2001.

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

SNYDER, R.D. Lovastatin enhances the genotoxicity of doxorubicin in Chinese hamster V79 cells via noncovalent DNA binding. **Drug and chemical toxicology**, New York, v. 32, n.1, p.17-20, 2009.

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

STAHL, W.; SIES, H. Physical quenching of singlet oxygen and cis-trans isomerization of carotenoids. *Annals of the New York Academy of Sciences*, New York, v.691, p.10-19, 1993

STRATTON, S.P.; SCHAEFER, W.H.; LIEBLER, D.C. Isolation and identification of singlet oxygen oxidation products of  $\beta$ -carotene. **Chemical Research in Toxicology**, Washington, v.6, p.542-547, 1993.

TAKEMURA, G.; FUJIWARA, H. Doxorubicin-Induced Cardiomyopathy From the Cardiotoxic Mechanisms to Management. **Progress in Cardiovascular Diseases**, Philadelphia, v.49, n.5, p.330-352, 2007.

TESORIERE, L.; CIACCIO, M.; VALENZA, M.; BONGIORNO, A.; MARESI, E.; ALBIERO, R.; LIVREA, M.A. Effect of vitamin A administration on resistance of rat heart against doxorubicin-induced cardiotoxicity and lethality. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Baltimore, v.269, n.1, p.430-436, 1994.

TEWEY, K.M.; ROWE, T.C.; YANG, L.; HALLIGAN, B.D.; LIU, L.F. Adriamycin-induced DNA damage mediated by mammalian DNA topoisomerase II. **Science**, New York, v.226, n.4673, p.466-468, 1984.

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

TITENKO-HOLLAND, N.; WINDHAM, G.; KOLACHANA, P.; REINISCH, F.; PARVATHAM, S.; OSORIO, A.M.; SMITH, M.T. Genotoxicity of malathion in human lymphocytes assessed using the micronucleus assay in vitro and *in vivo*: a study of malathion-exposed workers. **Mutation research**, Amsterdam, v.388(1), p.85-95, 1997.

TOCCHINI, L.; MERCADANTE, A.Z. Extração e determinação por CLAE de bixina e norbixina em colorificios. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.21, n.3, p.310-313, 2001.

TWEATS, D.J.; BLAKEY, D.; HEFLICH, R.H.; JACOBS, A.; JACOBSEN, S.D.; MORITA, T.; NOHMI, T.; O'DONOVAN, M.R.; SASAKI, Y.F.; SOFUNI, T.; TICE, R. IWGT Working Group. Report of the IWGT working group on strategy/interpretation for regulatory in vivo tests II. Identification of in vivo-only positive compounds in the bone marrow micronucleus test. **Mutation research**, Amsterdam, v.627, n.1, p.92-105, 2007.

VAN MIERT, E.; VANSCHEEUWIJCK, P.; MEURRENS, K.; GOMM, W.; TERPSTRA, P.M.. Evaluation of the micronucleus assay in bone marrow and peripheral blood of rats for the determination of cigarette mainstream-smoke activity. **Mutation research**, Amsterdam, v.652, n.2, p.131-138, 2008.

VANITHA, A.; MURTHY, K.N.; KUMAR, V.; SAKTHIVELU, G.; VEIGAS, J.M.; SAIBABA, P.; RAVISHANKAR, G.A. Effect of the carotenoid-producing alga, *Dunaliella bardawil*, on CC14-induced toxicity in rats. **International journal of toxicology**, Washington, v.26, n.2, p.159-167, 2007.

VASQUEZ, M.Z. Combining the in vivo comet and micronucleus assays: a practical approach to genotoxicity testing and data interpretation. **Mutagenesis**, Oxford, 2009. In Press. Disponível em <http://mutage.oxfordjournals.org/cgi/reprint/gep060v1>. Acesso em 14/01/2010.

VELANGANNI, A.A.; DHARANEEDHARAN, S.; GERALDINE, P.; BALASUNDRAM, C. Dietary supplementation of vitamin A, C and E prevents p-dimethylaminoazobenzene induced hepatic DNA damage in rats. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**, New Delhi, v.44, n.3, p.157-163, 2007.

VENKATESH, P.; SHANTALA, B.; JAGETIA, G.C.; RAO, K.K.; BALIGA, M.S. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by Aegle marmelos in mouse bone marrow: a micronucleus study. **Integrative cancer therapies**, Thousand Oaks, v.6, p.1, p.42-53, 2007.

VILE, G.F.; WINTERBOURN, C.C. Inhibition of adriamycin-promoted microsomal lipid peroxidation by beta-carotene, alpha-tocopherol and retinol at high and low oxygen partial pressures. **FEBS letters**, Amsterdam v.238, n.2, p.353-356, 1988.

WAGNER, L.A.; WARTHESEN, J.J. Stability of spray-dried encapsulated carrot carotene. **Journal of Food Science**, Champaign, v.60, p.1048-1053, 1995.

WAKATA, A.; MIYAMAE, Y.; SATO, S.; SUZUKI, T.; MORITA, T.; ASANO, N.; AWOGI, T.; KONDO, K.; HAYASHI, M. Evaluation of the rat micronucleus test with bone marrow and peripheral blood: summary of the 9th collaborative study by CSGMT/JEMS. MMS. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Environmental Mutagen Society of Japan. Mammalian Mutagenicity Study Group. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.32, n.1, p.84-100, 1998.

WANG, X.D.; RUSSELL, R.M. Procarcinogenic and anticarcinogenic effects of beta-carotene. **Nutrition Reviews**, Baltimore, v.57, n.9(Pt1), p.263-272, 1999.

WANG, Y.; WEI, D.; YANG, H.; YANG, Y.; XING, W.; LI, Y.; DENG, A. Development of a highly sensitive and specific monoclonal antibody-based enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) for detection of Sudan I in food samples. **Talanta**, London, v.77, n.5, p.1783-1789, 2009.

YAMAGISHI, M.; OSAKABE, N.; NATSUME, M.; ADACHI, T.; TAKIZAWA, T.; KUMON, H.; OSAWA, T. Anticlastogenic activity of cacao: inhibitory effect of cacao liquor polyphenols against mitomycin C-induced DNA damage. **Food and chemical toxicology**, New York, v.39, n.12, p.1279-1283, 2001.

YAMAUCHI, R.; MIYAKE, N.; INOUE, H.; KATO, K. Products formed by peroxy radical oxidation of beta-carotene. **Journal of agricultural and food chemistry**, Washington, v.41, n.5, p.708-713, 1993.

YNGVE, A. A Historical Perspective of the Understanding of the Link between Diet and Coronary Heart Disease. **American journal of lifestyle medicine**, Thousand Oak, v.3, n.1, 35S-38S, 2009.

YOO, S.H.; SONG, Y.B.; CHANG, P.S.; LEE, H.G. Microencapsulation of alpha-tocopherol using sodium alginate and its controlled release properties. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v.38, p.1, p.25-30, 2006.

ZHANG, P.; OMAYE, S.T. Antioxidant and prooxidant roles for beta-carotene, alpha-tocopherol and ascorbic acid in human lung cells. **Toxicology in vitro**, Oxford, v.15, n.1, p13-24, 2001.

ZHANG, Z.; DMITRIEVA, N.I.; PARK, J.H.; LEVINE, R.L.; BURG, M.B. High urea and NaCl carbonylate proteins in renal cells in culture and in vivo, and high urea causes 8-oxoguanine lesions in their DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v.101, n.25, p.9491-9496, 2004.




**ANEXO**

Termo de aprovação do trabalho frente à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA)

## **DECLARAÇÃO**

Declaramos que o trabalho (Protocolo nº 09.1.503.53.3), intitulado: "Avaliação da Atividade Antimutagênciã do beta-caroteno Microencapsulado em Células de Ratos Tratados com o Antitumoral Doxorubicina", de autoria de **Alexandre Ferro Aissa** e de **Maria de Lourde Pires Bianchi**, foi aprovado *Ad referendum* e referendado na reunião da Comissão de Ética no Uso de Animais, realizada em 07.07.2009.

Ribeirão Preto, 8 de julho de 2009.

  
Profa. Dra. Christie Ramos Andrade Leite Panissi  
Presidente da CEUA - em exercício