

**GABRIELA ELIBIO FAGUNDES**

**INFLUÊNCIA DE SUCOS DE HORTALIÇAS FONTE DE  
LUTEÍNA E BETA-CAROTENO SOBRE A GENOTOXICIDADE  
INDUZIDA POR AGENTES ALQUILANTES EM  
CAMUNDONGOS**

Dissertação de Mestrado  
apresentado ao Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde  
da Universidade do Extremo Sul  
Catarinense - UNESC para a  
obtenção do título de mestre em  
Ciências da Saúde.  
Orientador: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Vanessa  
Moraes de Andrade

**CRICIÚMA, NOVEMBRO DE 2012**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

F156i Fagundes, Gabriela Elibio.

Influência de sucos de hortaliças fonte de luteína e beta-caroteno sobre a genotoxicidade induzida por agentes alquilantes em camundongos. / Gabriela Elibio Fagundes ; orientadora: Vanessa Moraes de Andrade. – Criciúma : Ed. do Autor, 2012.

73 f. : il. ; 21 cm.

Dissertação (Mestrado) - Universidade do Extremo Sul Catarinense, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Criciúma, 2012.

1. Suco de hortaliças – Uso terapêutico. 2. Carotenoides. 3. Luteína. 4. Beta-caroteno. 5. Alimentos – Teor vitamínico.  
I. Título.

CDD 22. ed. 615.854

## **Folha informativa**

A dissertação foi elaborada seguindo o estilo Vancouver e será apresentada no formato tradicional. Este trabalho foi realizado nas instalações do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABIM) do Programa de Pós- graduação em Ciências da Saúde (PPGCS) na Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC em colaboração com o Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal da Universidade Federal de Santa Catarina.





UNIVERSIDADE DO EXTREMO SUL CATARINENSE - UNESC

Pró-Reitoria de Pós-Graduação, Pesquisa e Extensão

Unidade Acadêmica de Ciências da Saúde

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado)

Recomendado pela CAPES - Homologado pelo CNE - Portaria N° 1.919 de 03.06.2005

## PARECER

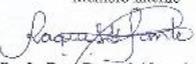
Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado de Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde (Mestrado e Doutorado) reuniram-se para realizar a arguição da Dissertação de MESTRADO apresentada pela candidata **Gabriela Elbio Fagundes** sob o título "**Influência de Sucos Fonte de Luteína e Betacaroteno sobre a Genotoxicidade Induzida por Agentes Alquilantes em Camundongos**" para obtenção do grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS DA SAÚDE** do Curso de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade do Extremo Sul Catarinense - UNESC.

Após haver analisado o referido trabalho e arguido a candidata, os membros são de parecer pela "**APROVAÇÃO**" da Dissertação, com conceito  B .

Criciúma, SC, 17 de dezembro de 2012

  
Prof. Dr. Cláudio Teodoro de Souza  
Membro Relator

  
Prof. Dra. Danièle Guimarães Machado  
Membro Interno

  
Prof. Dra. Raquel Alves dos Santos  
Membro Externo

  
Prof. Dra. Vanessa Moraes de Andrade  
Orientador

  
Prof. Dr. Emilio Luiz Streck  
Coordenador do PPGCS



Dedico esta dissertação aos meus pais, minha irmã e ao Ricardo, que não mediram esforços e paciência durante estes dois anos de mestrado.



## AGRADECIMENTO

Agradeço a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vanessa Moraes de Andrade, que exerceu brilhantemente seu papel de orientadora, num período de sua vida cheio de novas responsabilidades. Muito obrigada pelos ensinamentos, pela dedicação, pela amizade e pelo exemplo de pesquisadora.

Agradeço aos meus pais e irmã, pelo apoio moral e financeiro, e ao meu noivo Ricardo, que compreenderam o meu cansaço nas horas mais difíceis, e me incentivaram a continuar.

Agradeço a equipe do LABIM (Laboratório de Biologia Celular e Molecular), que não mediram esforços para por em prática todo o desenho experimental proposto para este trabalho.

Agradeço ao Laboratório de Morfogênese e Bioquímica Vegetal, representado pela Dra. Fernanda Ramlov e pelo Tiago José Griebeler Carvalho, que nos proporcionaram um aperfeiçoamento nos resultados deste estudo.

Por fim, agradeço ao Prof. Dr. Claudio Teodoro de Souza, a Prof. Dra. Raquel Alves dos Santos e a Dra. Daniele Guilhermano por disponibilizarem de seu tempo na participação da banca examinadora deste trabalho.



**“Tenha a sua nutrição diária não como  
tratamento alternativo, mas sim como  
alternativa de tratamento”**

**Denise Carreiro**



## RESUMO

**Introdução:** Os carotenóides representam um dos compostos bioativos mais estudados na atualidade, e se classificam em carotenos e xantofilas, que são representados principalmente por beta-caroteno e luteína, respectivamente. Estudos recentes têm associado às funções alegadas a esses carotenóides na sua forma sintética com proteção a danos causados ao DNA. Dessa forma o presente estudo teve por objetivo verificar o efeito em nível de dano em DNA de sucos de fontes alimentares desses carotenóides (couve e suco verde comercial), bem como da luteína isolada e beta-caroteno isolado. Além disso, foram analisados nestes sucos, através da Cromatografia Líquida de Alta Performance, a presença e a quantidade destes carotenóides, além de determinar a capacidade dos itens testados em modular a ação do metil metanosulfonato (MMS) e da ciclofosfamida (CP), agentes sabidamente genotóxicos, *in vivo* em células de camundongos através do Ensaio Cometa. **Materiais e métodos:** Foram utilizados camundongos albinos Swiss machos adultos, obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Foram divididos em 23 grupos, com 6 camundongos por grupo. Após os tratamentos foram coletadas amostras de sangue de todos os animais através de incisão na extremidade da caudapara a realização do Ensaio Cometa nos tempos 24h e 48h. **Resultados:** Os grupos que receberam os sucos no pré-tratamento apresentaram redução de dano maior que 50%, e os que receberam os compostos sintéticos isolados apresentaram uma redução de aproximadamente 20%. No pós-tratamento o reparo de dano se manteve semelhante ao pré-tratamento. **Conclusão:** Os sucos utilizados no estudo, assim como os carotenóides sintéticos não apresentaram ação genotóxica. Além disso, apresentaram ação protetora e de reparo no pré e pós-tratamento, respectivamente. Foi observado efeito benéfico mais acentuado nos grupos que receberam os sucos, mostrando que o sinergismo dos compostos presentes no alimento foi mais eficaz comparado aos compostos sintéticos isolados.

**Palavras-chave:** Luteína, Beta-caroteno, Sucos couve, suco verde, Getonoxidade, Ensaio Cometa



## ABSTRACT

**Background:** Carotenoids represent one of the most studied bioactive compounds, and are classified into carotenes and xanthophylls, which are mainly represented by beta-carotene and lutein, respectively. Recent studies related roles of these carotenoids in its synthetic form of protection with DNA damage. **Objective:** The aim of present study was to verify the effect of juices source of these carotenoids (kale juice and green juice) in level of DNA damage, as well as lutein and beta-carotene isolated. Moreover, analyze the presence and amount of these carotenoids in juices and to determine the ability of items tested in modulating the action of methyl methanesulfonate (MMS) and cyclophosphamide (CP), *in vivo*. **Design:** Albinos swiss male mice were divided into 23 groups with 6 mice per group. After the treatments were collected blood samples from animals through an incision at the tail end for performing of Comet Assay in time 24h and 48h. The carotenoids were quantified in the juices with the High Performance Liquid Chromatography (HPLC). **Results:** The groups that received the juices in pre-treatment showed damage reduction greater than 50%, and those received the compounds isolated showed a reduction of approximately 20%. Similar results to post-treatment. **Conclusions:** The juices and carotenoids showed a protective action and repair in pre and post-treatment, respectively. It was observed beneficial effect more pronounced in the groups that received juices, showing the synergism of the compounds present in the food matrix was more effective compared with single compounds.

**Keywords:** Lutein, Beta-carotene, Kale juice, Green juice, Genotoxicity Comet Assay



## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Ciclização do licopeno a $\alpha$ e $\beta$ - caroteno e formação das xantofilas a partir do $\alpha$ e $\beta$ -caroteno.....	27
<b>Figura 2:</b> Visualização no microscópio de leucócitos com vários tipos de dano, onde a “cabeça” representa o núcleo original e a “cauda” os fragmentos de DNA .....	35
<b>Figura 3:</b> Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) do extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de: A - suco de couve (02/2012);B - suco verde comercial (02/2012). Picos: 1 - luteína; 2 - zeaxantina livre; 3 -trans- $\beta$ -caroteno; 4 - cis- $\beta$ -caroteno.....	46
<b>Figura 4:</b> Índice de dano em DNA induzido por água, suco natural de couve, suco verde comercial, luteína na dose de 0,2mg/kg de peso corporal, $\beta$ -caroteno na dose de 2,5mg/kg de peso corporal e pelos agentes alquilantes metil metanosulfonato (MMS) e ciclofosfamida(CP), avaliados através do Ensaio Cometa em leucócitos de sangue periférico. *Valores significantes em relação a todos os outros grupos tratados (P < 0,01, ANOVA, Tukey).....	49
<b>Figura 5:</b> Índice de Dano avaliado pelo Ensaio Cometa em leucócitos de sangue periférico de camundongos tratados com metil metanosulfonato (MMS) e pré ou pós-tratados com luteína (LT) (A), beta-caroteno (BC) (B), suco de couve (SCV) (C), suco verde comercial (SVC) (D). <sup>a</sup> Valores estatisticamente significativos com P<0,01 (teste U), <sup>b</sup> P<0,0001 (teste U), <sup>c</sup> P<0,001 (teste U).....	52
<b>Figura 6:</b> Índice de Dano avaliado pelo Ensaio Cometa em leucócitos de sangue periférico de camundongos tratados com ciclofosfamida (CP) e pré ou pós-tratados com luteína (LT) (A), beta-caroteno (BC) (B), suco de couve (SCV) (C), suco verde comercial (SVC) (D). <sup>a</sup> Valores estatisticamente significativos com P<0,0001 (teste U), <sup>b</sup> P<0,0001 (teste t), <sup>c</sup> P<0,001 (teste U). .....	53



## LISTA DE TABELA

<b>Tabela 1:</b> Desenho Experimental: horário de administração dos compostos, coleta de sangue e morte dos animais. ....	40
<b>Tabela 2:</b> Concentração dos carotenóides ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de suco de couve e suco comercial. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções ( $10 \mu\text{L}$ ) $\pm$ desvio padrão.....	48
<b>Tabela 3:</b> Detecção de dano em DNA por Ensaio Cometa (FD e ID) em células sanguíneas de camundongos expostos a água, Luteína (LT), e/ou ciclofosfamida (CP) ou metil metanosulfonato (MMS) e amostrados em 24h (com e sem pré-tratamento com LT) ou 48h (com ou sem pós-tratamento com LT) .....	54
<b>Tabela 4:</b> Detecção de dano em DNA por Ensaio Cometa (FD e ID) em células sanguíneas de camundongos expostos a água, Beta-caroteno (BC), e/ou ciclofosfamida (CP) ou metil metanosulfonato (MMS) e amostrados em 24h (com e sem pré-tratamento com BC) ou 48h (com ou sem pós-tratamento com BC).....	56
<b>Tabela 5:</b> Detecção de dano em DNA por Ensaio Cometa (FD e ID) em células sanguíneas de camundongos expostos a água, Suco Natural de Couve (SNC), e/ou ciclofosfamida (CP) ou metil metanosulfonato (MMS) e amostrados em 24h (com e sem pré-tratamento com SNC) ou 48h (com ou se pós-tratamento com SNC).....	58
<b>Tabela 6:</b> Detecção de dano em DNA por Ensaio Cometa (FD e ID) em células sanguíneas de camundongos expostos a água, Suco Verde Comercial (SVC), e/ou ciclofosfamida (CP) ou metil metanosulfonato (MMS) e amostrados em 24h (com e sem pré-tratamento com SVC) ou 48h (com ou sem pós-tratamento com SVC). ....	60



## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	<b>25</b>
1.1 ALIMENTOS COMO FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS	25
1.2 CAROTENÓIDES .....	26
1.3 LUTEÍNA E BETA-CAROTENO: SEUS EFEITOS ISOLADOS E NA MATRIZ ALIMENTAR .....	28
1.4 BRASSICA OLERACEA L. VAR. ACEPHALA D.C. ....	30
1.5 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE .....	31
1.6 ENSAIO COMETA .....	33
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	<b>37</b>
2.1 OBJETIVO GERAL .....	37
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>38</b>
3.1. ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA .....	38
<b>3.1.1 Critérios de inclusão/ suspensão e encerramento da pesquisa</b>	<b>38</b>
<b>3.1.2 Local de realização da pesquisa</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.3 Destino dos animais após o experimento</b> .....	<b>38</b>
<b>3.1.4 Cálculo de dose e preparo da amostra</b> .....	<b>39</b>
3.2 DESENHO EXPERIMENTAL.....	39
3.3 COLETA DO MATERIAL E CUIDADO COM OS ANIMAIS ....	43
3.4. ENSAIO COMETA IN VIVO .....	43
3.5 CLAE (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA) .....	44
<b>3.5.1 Extração e quantificação de carotenóides</b> .....	<b>44</b>
<b>3.5.2 Saponificação</b> .....	<b>44</b>
<b>3.5.3 Detecção de carotenóides por CLAE</b> .....	<b>44</b>
3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS .....	45
<b>4 RESULTADOS</b> .....	<b>46</b>



4.1 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE CAROTENÓIDES POR CLAE .....	46
4.2 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE DO SUCO NATURAL DE COUVE, SUCO VERDE COMERCIAL, LUTEÍNA E BETA-CAROTENO ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA.....	48
4.3 ANÁLISES DA ANTIGENOTOXICIDADE DO SUCO NATURAL DE COUVE, SUCO VERDE COMERCIAL, LUTEÍNA E BETA-CAROTENO ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA.....	50
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>62</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>68</b>



## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 ALIMENTOS COMO FONTES DE COMPOSTOS BIOATIVOS

A alimentação representa a manifestação da organização social e pode ser considerada a chave simbólica dos costumes em qualquer que seja a sociedade, além de ser um dos fatores comportamentais que mais influencia a qualidade de vida das pessoas (Assis e Nahas, 1999). Estudos sobre os hábitos alimentares do mediterrâneo e da população asiática constataram um consumo elevado de alimentos de fonte vegetal, e uma baixa incidência de doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como doenças cardiovasculares, disfunções metabólicas e câncer. Afirmação que impulsionou o estudo sobre a presença não só de nutrientes na alimentação diária, mas também de outros compostos não nutrientes que atuam diretamente em alvos fisiológicos específicos, interferindo no processo patogênico dessas doenças (Sabaté, 2003; Minich, 2008).

A partir daí concluiu-se que os alimentos de origem vegetal são fontes de macro nutrientes, vitaminas, minerais, e também de compostos bioativos. E, além disso, estudos epidemiológicos passaram a afirmar que a ingestão insuficiente de compostos bioativos provenientes de vegetais é fator de risco para DCNT, assim como o consumo excessivo de energia e de gorduras totais e saturadas na dieta, contribuindo na mesma magnitude (Sabaté, 2003; Bastos *et al.*, 2009; Sofi *et al.*, 2010). O estudo destes compostos nos alimentos inspirou o conceito de alimentos funcionais, que são aqueles que além de exercer funções nutricionais básicas produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde (ANVISA, 1999).

Os compostos bioativos são metabólitos secundários do sistema de defesa químico das plantas contra radiação ultravioleta, insetos ou patógenos. Ocorrem em pequenas quantidades nos alimentos, e na dieta habitual alguns gramas por dia são ingeridos. No entanto, as concentrações desses compostos no organismo humano são muito baixas, o que está relacionado à sua limitada absorção e biodisponibilidade (Manach *et al.*, 2007).

Biodisponibilidade refere-se à concentração de um determinado composto ou de seus metabólitos na circulação, órgãos e/ou tecidos em relação ao total ingerido do mesmo. A baixa biodisponibilidade destes compostos bioativos justifica-se pelo fato de alguns destes serem reconhecidos pelo organismo humano como xenobióticos e, além disso,

sua determinação mais precisa ser dificultada pela necessidade de avaliação de órgãos humanos *in vivo* (Jacobs e Tapsell, 2007).

Esses compostos variam extensamente em estrutura química e, conseqüentemente, na função biológica e mecanismos de ação. Sua ação antioxidante, por exemplo, deve-se ao potencial de óxido-redução de algumas moléculas, à capacidade de competir por sítios ativos e receptores nas estruturas celulares, e à modulação da expressão gênica. Além disso, atuam na modulação de enzimas de detoxificação, estimulação do sistema imune, modulação do metabolismo hormonal, redução da pressão sanguínea, entre outras funções. Porém, por outro lado, não são sintetizados pelo organismo humano e nem considerados essenciais ao seu crescimento e às funções vitais, por isso não são denominados nutrientes (Manach *et al.*, 2007; Bastos *et al.*, 2009).

Perante o grande número de compostos bioativos existentes na natureza, eles podem ser subdivididos em grupos com milhares de compostos distintos. Entre eles os polifenóis, como a isoflavona presente na soja, o subgrupo dos glicosinolatos, como o sulforafano e indol-3-carbinol, presente nas brássicas. E por fim, os carotenóides, que serão enfocados a seguir (Cozzolino, 2009).

## 1.2 CAROTENÓIDES

Os carotenóides representam uma família de compostos que compreendem mais de 750 pigmentos encontrados na natureza. Promovem colorações que variam do amarelo, passando pelo verde e laranja, até o vermelho intenso nos vegetais, plantas, algas e alguns microorganismos onde são sintetizados. Aproximadamente 40 destes são encontrados na dieta, sendo que  $\alpha$ -caroteno,  $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, luteína, zeaxantina e licopeno são responsáveis por aproximadamente 90% das concentrações plasmáticas de carotenóides, e alguns destes são precursores de vitamina A (Zhao *et al.*, 2006; Cozzolino, 2009).

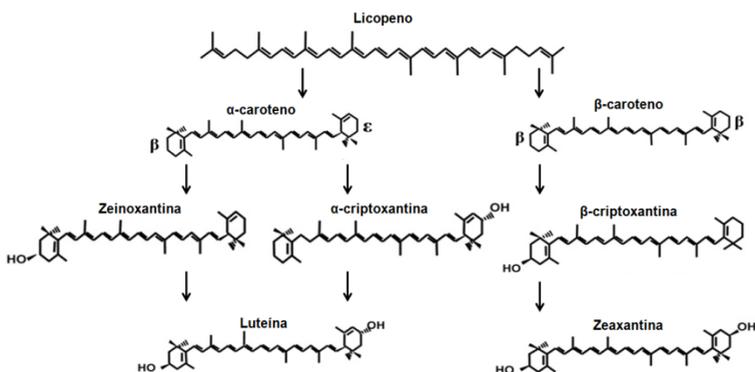
Independente da capacidade precursora de vitamina A, os carotenóides desempenham um importante papel antioxidante, por possuírem uma grande capacidade sequestrante do oxigênio singlete. Sua característica estrutural influencia diretamente em suas características químicas. Estruturalmente são formados por uma longa cadeia de duplas ligações conjugadas, geralmente contendo 40 átomos de carbono (tetraterpenos), com uma ou duas estruturas cíclicas (anel  $\beta$ -

ionona) que terminam em ligações conjugadas, o que garante sua capacidade de captação de radicais livres (Mascio *et al.*, 1991).

Esta capacidade antioxidante está diretamente ligada a sua função protetora contra o câncer, assim como a modulação do metabolismo do carcinoma, inibição da proliferação celular, aumento da diferenciação celular via retinóides, estimulação da comunicação entre as células e aumento da resposta imune (Paiva e Russell, 1999; Tanaka *et al.*, 2012).

Podem ser formados a partir de duas vias biossintéticas: a via clássica, conhecida como via do mevalonato e a via alternativa, também chamada de via do metileritritol fosfato. Em ambas as vias há a formação de substrato precursor do primeiro carotenóide de 40 carbonos, o fitoeno. Após processos de dessaturação, o fitoeno é transformado em licopeno, que é substrato para reações de ciclização. Após esse processo, os carotenóides podem ser divididos em carotenos e xantofilas, que são formados através da oxigenação dos carotenos, pela adição de grupamento hidroxila, carbonila, éter, acetato e epóxido. Beta-caroteno e licopeno são exemplos de carotenos, enquanto luteína, zeaxantina são exemplos de xantofilas. A figura 1 mostra o esquema de biossíntese dos carotenóides (Bramley, 2002; Ambrósio *et al.*, 2006).

Figura 1: Ciclização do licopeno a  $\alpha$  e  $\beta$ - caroteno e formação das xantofilas a partir do  $\alpha$  e  $\beta$ -caroteno



Fonte: (adaptado de Quinlan *et al.* 2012).

Para que ocorra sua correta digestão e absorção é necessário seu desprendimento do alimento de origem, e isso ocorre durante a cocção, a mastigação, a deglutição e também no estômago. Em grande parte são moléculas hidrofóbicas, e por consequência desta característica, seu

processo de absorção e transporte torna-se semelhante ao dos lipídeos. Dessa forma, sua biodisponibilidade está diretamente relacionada à presença de lipídeos na dieta, a correta produção de bile e adequada presença de fibras na alimentação (Furr e Clark, 1997; Rodriguez-Amaya, 1999).

Após a absorção, os carotenóides são transportados via linfa, e pela circulação portal até o fígado. Nessa etapa são incorporados às lipoproteínas, e a distribuição entre as classes destas é determinada por características físicas individuais dos carotenóides e pela composição lipídica das lipoproteínas. A partir daí, podem exercer seu papel em nível molecular (Parker, 1996).

### 1.3 LUTEÍNA E BETA-CAROTENO: SEUS EFEITOS ISOLADOS E NA MATRIZ ALIMENTAR

A luteína é o segundo carotenóide mais prevalente no plasma humano, e por estar presente principalmente na mácula lútea, além de exercer atividade antioxidante, também tem importante função protetora contra degeneração macular relacionada à idade e proteção contra a radiação ultravioleta (Khachik *et al.*, 1997; Ma *et al.*, 2011; Azqueta e Collins, 2012).

Estudos recentes têm associado as funções atribuídas a luteína sintética com proteção a danos causados ao DNA, isolada ou em associação com outros carotenóides, principalmente zeaxantina, que também é predominante na mácula lútea. Serpeloni *et al.*(2012) avaliaram os efeitos de proteção da luteína perante estresse oxidativo e dano em DNA causado pela cisplatina em uma linhagem de células humanas derivadas do fígado. Eles concluíram que a luteína não apresenta atividade genotóxica, além de exercer ação antioxidante e protetora ao DNA.

Com o intuito de avaliar o efeito da luteína na proteção de dano à retina, Sasaki *et al.*(2012) analisaram a retina de camundongos expostos a luz que receberam luteína e dieta normal. Obtiveram resultados positivos ao mensurar a função visual dos animais e observar mudanças histológicas, ou seja, a suplementação do carotenóide atenuou o comprometimento visual induzido pela luz por proteger o DNA das células fotorreceptoras.

O Beta-caroteno situa-se como o carotenóide mais abundante na alimentação humana, e umas das suas principais atividades é a de precursor de vitamina A. Exerce função antioxidante e protetora ao

DNA, e por se depositar em maior quantidade na pele humana, desempenha importante função fotoprotetora.

Ao associar, *in vitro*, a atividade tóxica da aflatoxina com carotenóides como o licopeno e/ou beta-caroteno, Reddy *et al.* (2006) chegaram a resultados que demonstraram que as células pré-tratadas com os carotenóides foram protegidas dos efeitos tóxicos da aflatoxina, tanto em nível celular, como também em nível molecular. Em contrapartida, Yurtcu *et al.* (2011) avaliaram os efeitos protetores do beta-caroteno em uma linhagem de células de carcinoma hepatocelular humano. Para isso utilizaram das técnicas de ensaio cometa para avaliar o dano em DNA e TBARS para a avaliação da peroxidação lipídica. Os resultados obtidos neste estudo mostraram um aumento da ocorrência de dano em DNA nas células tratadas com o carotenóide, além de um aumento na peroxidação lipídica.

Com o intuito de esclarecer o mecanismo de ação do beta-caroteno na indução de danos oxidativos, van Helden *et al.* (2009) avaliaram os efeitos do beta-caroteno e de seus metabólitos na genotoxicidade induzida por neutrófilos, uma vez que há influxo de neutrófilos nas vias aéreas de organismos expostos ao cigarro e ao amianto, e conseqüente aumento das espécies reativas de oxigênio e aumento das lesões pró-mutagênicas no DNA. Seus resultados mostraram que os metabólitos do beta-caroteno apresentaram capacidade de inibir a enzima mieloperoxidase em combinação com o aumento da formação de radical hidroxila por induzir a reação de Fenton.

Os trabalhos citados acima nos mostram que estas substâncias não exercem somente efeitos benéficos à saúde humana, e nos faz ressaltar sua oferta no alimento. Nesse contexto, muitos trabalhos investigam o desempenho destes carotenóides na matriz alimentar. Horst *et al.* (2010) estudaram o comportamento do extrato aquoso de couve e repolho em ratos que foram submetidos a um modelo animal de hepatocarcinoma. Para isso, analisaram o fígado dos animais tratados, e encontraram uma redução de dano em DNA dos animais que receberam os extratos dos vegetais, e uma maior concentração de luteína no fígado destes animais.

Em humanos, Pool-Zobel *et al.* (1997) encontrou uma redução dos níveis de dano em DNA endógenos após administrar produtos derivados do tomate, espinafre e cenoura, alimentos fontes de carotenóides, em homens adultos, saudáveis e não fumantes. Além disso, obtiveram uma significativa redução de danos oxidativos basais após a administração de

suco de cenoura. Resultados que suportam a hipótese que os carotenóides presentes nos vegetais utilizados no estudo exercem um efeito protetor ao câncer por diminuir o dano oxidativo no DNA em humanos.

Adicionalmente, Briviba *et al.*(2008) ao avaliar os efeitos da administração de diferentes porções de vegetais e frutas (2, 4 ou 8 porções/dia) em homens não fumantes durante 4 semanas, encontraram altas concentrações de luteína, zeaxantina, alfa e beta-caroteno no plasma dos indivíduos que receberam 8 porções/ dia de vegetais e frutas significativamente maiores que naqueles que receberam 2 porções/ dia. Porém, esse aumento nas concentrações plasmáticas não promoveu uma diferença nos níveis de dano endógeno no DNA, peroxidação lipídica e marcadores de capacidade antioxidante nos indivíduos avaliados.

#### 1.4 BRASSICA OLERACEA L. VAR.ACEPHALA D.C.

Pertencente à família das *Brassicaceae*, a *Brassica oleracea* L. var.*acephala* D.C. é popularmente conhecida no Brasil como couve manteiga ou couve de folhas. Apresenta um cultivo típico de outono e inverno, mas com tolerância ao calor, por isso pode ser plantada durante o ano todo em diferentes regiões do Brasil. É extensamente utilizada na medicina tradicional brasileira, principalmente exercendo funções de alívio aos sintomas de úlcera gástrica (Catálogo Brasileiro de Hortaliças, 2011).

Lemos *et al.*(2011) utilizou dois modelos animais de ulcera gástrica (etanol/HCl e antiinflamatórios não-esteroidais) para avaliar o efeito reparador do extrato hidroalcoólico da *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C.. Em ambos os modelos foi observado uma atividade antiúlcera do extrato, sugerindo que este efeito seja relacionado à habilidade do extrato em estimular a síntese de muco, aumentando o pH e diminuindo os íons  $H^+$  no estomago.

Por ser um vegetal folhoso verde escuro, apresenta-se como uma ótima fonte de carotenóides, e outros flavonóides na alimentação humana, dessa forma comporta-se como uma fonte de antioxidantes. Gonçalves *et al.*(2012) avaliaram o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico do extrato hidroalcoólico da *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. em diferentes células de camundongos. Os resultados obtidos neste estudo mostraram que nenhuma das concentrações utilizadas (500, 1000 e 2000mg/kg) do extrato hidroalcoólico de *Brassica oleracea* L. var.*acephala* D.C. mostrou efeito genotóxico pelo

ensaio cometa, ou clastogênico pelo teste de micronúcleo. Além disso, a couve foi capaz de promover uma inibição de dano em DNA induzido pela doxorubicina, efeito este que poderia ser justificado pela presença de antioxidantes no extrato administrado.

Há inúmeros relatos na literatura sobre o benefício de sucos verdes comerciais, contendo *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C., assim como outros vegetais folhosos verdes escuros em associação. Por exemplo, Kang *et al.* (2004) mostraram resultados referentes à uma ação protetora do suco verde comercial de vegetais contra o câncer. Eles observaram uma diminuição de dano oxidativo ao DNA humano após avaliar vinte indivíduos fumantes tratados com suco verde durante oito semanas. Além deste, Bradi *et al.* (2005) demonstraram uma ação quimiopreventiva do suco verde em linhagens celulares de câncer de mama humano, observando uma supressão da proliferação celular.

## 1.5 GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE

A genotoxicidade é o setor da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja em sua estrutura física-química, o DNA (Ácido desoxirribonucléico), processo esse classificado como mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético em nível celular ou orgânico, identificados respectivamente como carcinogênese e teratogênese (Erdtmann, 2003).

A mutação é definida como sendo qualquer alteração do DNA, ou seja, o sistema mutacional é desagregador em princípio, mas também é provedor de variabilidade para a seleção. As mutações propriamente ditas são classificadas em gênicas e cromossômicas. As gênicas referem-se a mudanças de uma ou poucas sub-unidades, os quatro nucleotídeos do polímero de DNA, por substituição, perda ou ganho destas sub-unidades; alterando geralmente apenas o funcionamento de um gene. Nas mutações cromossômicas não haveria uma alteração na composição dos nucleotídeos, mas uma reorganização na estrutura dos polímeros de DNA – os cromossomos, por translocação, inversão ou mesmo ganho ou perda de partes maiores destes cromossomos. Podemos notar, que eventualmente a mutação gênica e cromossômica podem se sobrepor, como por exemplo, uma translocação pode destruir a estrutura de um gene. Pode também alterar a regulação de genes sem alterar a composição das sub-unidades do DNA, por efeito de posição. Das mutações pode decorrer uma série de problemas, na grande maioria das vezes os resultados das mutações são maléficos, incluem malformações,

câncer, envelhecimento e morte. Mas também das mutações decorre a maravilhosa variabilidade dos seres em todas as suas expressões (Erdtmann, 2003).

O DNA para exercer sua função, necessita interagir com outras moléculas, essencialmente proteínas para poder ser transcrito e duplicado. Cada etapa representa um risco de erro, sendo que tais erros podem ocorrer naturalmente. O DNA é um arquivo de informações, enquanto o RNA (ácido ribonucléico) transfere tais informações para que ocorra a tradução de proteínas a partir de aminoácidos. Se ocorrer uma alteração na molécula de DNA pode haver uma mudança nos aminoácidos, o que transformaria a receita da proteína pré-determinada pelo material genético, deixando-a menos eficaz ou totalmente ineficaz (Erdtmann, 2003).

Todos os organismos têm a capacidade de detectar e corrigir mutações que ocorrem no seu material genético. Para controlar os erros estão de prontidão sistemas de reparo do DNA. Já se tem relatos, hoje em dia, de produtos e químicos que reduzem ou previnem as mutações, sendo chamados de agentes antimutagênicos ou antigenotóxicos (Saffi e Henriques, 2003).

O termo “antimutagênico” foi usado originalmente por Novick e Szilard em 1952 para descrever os agentes que reduzem a frequência de mutação espontânea ou induzida, independente do mecanismo envolvido (Liviero e Von Borstel, 1996). Os agentes que previnem o câncer podem ser incluídos em duas categorias principais: os que previnem a iniciação do processo carcinogênico, por meio de bloqueio das mutações (agentes antimutagênicos ou bloqueadores) e os que interferem sobre a promoção ou a progressão das lesões que foram previamente fixadas (agentes supressores ou anticarcinogênicos). Entretanto a quimioprevenção no controle do câncer depende da obtenção de agentes que não atuem apenas como antimutagênicos, mas que tenham a capacidade adicional de alterar os padrões de expressão gênica.

Kada *et al.* (1978) classificaram os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos em dois processos, denominados de desmutagênese e bioantimutagênese. Na desmutagênese, os agentes antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutagênicos ou seqüestrando moléculas reativas. Na bio-antimutagênese, os agentes antimutagênicos atuam

sobre o processo de fixação das mutações, ou no reparo das lesões causadas no DNA.

De Flora (1998), propôs uma classificação dos inibidores de mutagênese e carcinogênese em três níveis de prevenção, considerando o modo de ação dos antimutagênicos e/ou anticarcinogênicos, assim como o ambiente de ação, extra ou intracelular. A prevenção primária inibe a mutação e a iniciação do câncer, tanto pelo ambiente externo quanto interno da célula. A prevenção secundária considera os vários mecanismos que inibam a progressão do tumor à condição de malignidade. A prevenção terciária refere-se à inibição das metástases.

Os mecanismos extracelulares envolvidos na prevenção de mutágenos e/ou carcinógenos são: inibição da penetração ou remoção do agente do organismo; inibição da formação endógena de mutágenos; formação de complexo inativo, diluição e/ou desativação do mutágeno/carcinógeno; favorecimento da absorção de agentes protetores. Entre as vias envolvidas na inibição de mutação e iniciação do câncer por mecanismos celulares, podemos citar: desintoxicação celular; modificação no transporte trans-membrana; modulação do metabolismo celular; inibição da replicação celular; modulação no sistema de reparo do DNA; controle da expressão gênica (De Flora, 1998). A modulação de apoptose também é um importante mecanismo de ação dos agentes quimiopreventivos (Ferguson, 1994).

O potencial antimutagênico de uma substância pode ser avaliado em sistemas biológicos diversos (*in vivo* e/ou *in vitro*), incluindo os mesmos empregados para o estudo e identificação dos agentes mutagênicos. Outros mecanismos, como bactérias e fungos, também são usados na avaliação do potencial antimutagênico (Antunes e Araújo, 2000).

## 1.6 ENSAIO COMETA

O Teste cometa ou SCGE (Single Cell Gel Electrophoresis Assay) é um teste de genotoxicidade capaz de detectar danos ao DNA induzidos por agentes alquilantes, intercalantes e oxidantes. Este pode ser realizado tanto em animais como em plantas, demonstrando grande sensibilidade e rapidez de resultados em estudos de genotoxicidade (Silva *et al.*, 2003). Apresenta algumas vantagens sobre os testes bioquímicos e citogenéticos, como: (a) versatilidade em relação ao tipo de célula a ser analisada, sendo que o método já foi adaptado a qualquer tipo de célula, além de ser aplicado a diversos organismos; (b)

necessidade de somente um pequeno número de células; (c) não ser necessário células em divisão. Pode ser usado em testes *in vitro* e *in vivo* de indução de danos ao DNA (Collins *et al.*, 1997; Tice *et al.*, 2000; Sekihashi *et al.*, 2002; Valverde *et al.*, 2002; Juchimiuk *et al.*, 2006). A elevada praticidade e o baixo custo deste teste em relação a outros determinam a ampla aplicabilidade como um teste de avaliação da genotoxicidade (Cotelle & Féraud, 1999; Garcia *et al.*, 2004).

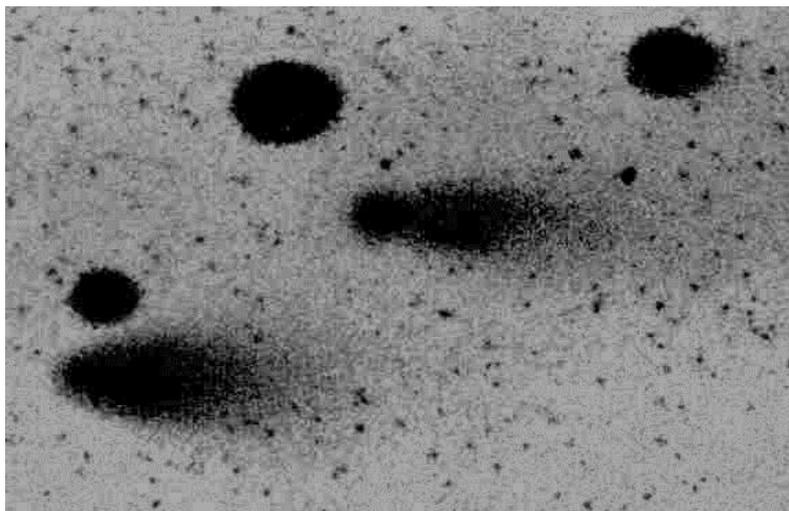
O Ensaio Cometa não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo Ensaio Cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o Ensaio Cometa pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo (Albertini *et al.*, 2000).

A técnica do Ensaio Cometa consiste em obter, a partir de células individualizadas, colocadas em agarose, lisadas, submetidas à eletroforese e coradas, uma matriz com um halo fluorescente, formado por DNA não danificado e que não migrou. Células com DNA danificado formam um cometa, consistindo de uma cabeça (matriz nuclear) e uma cauda (DNA quebrado). A extensão do DNA que migrou está correlacionado com o dano ocorrido (Tice *et al.*, 2000).

São várias as maneiras de se analisar os padrões dos cometas as quais podem ser visuais: Com ou seu cauda (%); Comprimento do cometa ou da cauda; Razão do comprimento do cometa pelo diâmetro perpendicular da cabeça do cometa; Classificação em categorias de migração e obtenção de escore Esta última leva a uma classificação em 5 diferentes classes (de 0 a 4), onde 0 representa células sem danos enquanto as classes de 1 a 4 representam níveis de danos crescentes (Figura 2). Desta forma obtém-se um valor arbitrário, definido como índice de danos (ID), que expressa a genotoxicidade geral da população de células. O índice de dano é calculado somando-se o número de células em cada classe multiplicado pelo valor atribuído de cada classe (0 a 4) na qual foram incluídas. Assim este índice pode variar de 0 (sem dano, 100 células x 0) a 400 (dano máximo, 100 células x 4) (Collins *et al.*, 1997; Tice *et al.*, 2000). Os núcleos intactos aparecem redondo, enquanto que nas células lesadas, o DNA livre migra do núcleo em direção ao ânodo, mostrando uma “cauda” de fragmentos semelhantes a um cometa.

Além da análise visual, também existe a possibilidade de análise por analisador de imagem: Comprimento do cometa ou da cauda; Porcentagem de DNA na cauda; Momento da cauda (*tail moment*) e Área do cometa.

Figura 2: Visualização no microscópio de leucócitos com vários tipos de dano, onde a “cabeça” representa o núcleo original e a “cauda” os fragmentos de DNA



Fonte: Do autor

Existem basicamente dois tipos de protocolos para este teste: (a) tratamento neutro, que detecta quebra dupla no DNA; e (b) tratamento alcalino, que detecta quebras simples e duplas de cadeia, diretas ou induzidas por lesões nas bases do DNA (como oxidação, metilação ou outros adutos), cujo procedimento transforma essas anomalias em lesões álcali-lábeis (Fairbairn *et al.*, 1995).

Sabendo que os estudos recentes que avaliaram as funções protetoras da luteína e do beta-caroteno fizeram uso de suas formas isoladas em sua maioria em concentrações superiores ao encontrado nos alimentos fontes destes carotenóides, e considerando a importância das interações entre os diversos compostos químicos da dieta e do próprio alimento fonte para maximizar a biodisponibilidade do composto bioativo, o presente estudo teve por objetivo verificar o comportamento em nível de dano em DNA, do suco natural de couve, de uma opção comercial de

suco de vegetais verdes, bem como da luteína e do beta-caroteno isolados. Além disso, analisamos nestes sucos a presença e a quantidade destes carotenóides. Adicionalmente buscamos avaliar a capacidade dos itens testados em modular a ação de agentes sabidamente genotóxicos como a ciclofosfamida (CP) e o metil metanosulfonato (MMS) *in vivo* em células de camundongos, através do Ensaio Cometa.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vivo* o efeito do suco de couve, e do suco verde comercial, além da luteína isolada e do beta-caroteno isolado, sobre a genotoxicidade induzida pelos agentes alquilantes metil metanosulfonato (MMS) e ciclofosfamida (CP), utilizando o Ensaio Cometa.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Investigar a capacidade antigenotóxica dos sucos natural de couve e do suco verde comercial, bem como de uma dosebiologicamente ativa de luteína e de beta-caroteno isolados;
2. Detectar a presença de compostos bioativos nos sucos natural de couve e no suco verde comercial;
3. Avaliar os resultados obtidos das diferentes fontes de luteína e beta-caroteno utilizadas, bem como a ação dos carotenóides em sua forma isolada, de forma a fornecer maior segurança quanto a indicação terapêutica destes carotenóides.

## **3 MATERIAL E MÉTODOS**

### **3.1. ANIMAIS E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

Camundongos albinos Swiss machos adultos foram obtidos do biotério da Universidade do Extremo Sul Catarinense. Eles foram divididos em 23 grupos, com 6 camundongos por grupo, totalizando 138 animais, que foram alojados em caixas de polietileno, com livre acesso a comida e água e mantidos em um ciclo de 12 horas luz-escuro (a luz é ligada às 7h da manhã), com temperatura controlada de  $22\pm 1^{\circ}\text{C}$ . Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UNESC, constando no protocolo número 109/2011, e os experimentos foram conduzidos de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA.

#### **3.1.1 Critérios de inclusão/ suspensão e encerramento da pesquisa**

Foram incluídos no experimento camundongos machos de 30 a 45g, saudáveis, sendo excluídos da pesquisa aqueles que morreram durante o experimento ou que apresentaram alguma reação adversa ao tratamento durante o mesmo. Todos os equipamentos, reagentes e drogas necessárias para a realização deste projeto estiveram disponíveis ao proponente, corroborando com isto, não houve riscos de vida para os animais, com isso, não houve critérios aparentes para suspensão ou encerramento da pesquisa.

#### **3.1.2 Local de realização da pesquisa**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LABIM), localizado no Bloco S da Universidade do Extremo Sul Catarinense (UNESC) e que é um dos laboratórios do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. Dispõe de infraestrutura e de equipamentos necessários para as atividades de cultivo celular, biologia molecular e análises toxicogenéticas.

#### **3.1.3 Destino dos animais após o experimento**

Ao término do experimento, os animais foram descartados em saco branco leitoso com identificação de contaminado, transportados ao biotério onde foram armazenados em freezer até que empresa

terceirizada deu o destino final correto. Os resíduos foram tratados fisicamente e posteriormente encaminhados para disposição final em aterro sanitário. Todos os procedimentos são conforme RDC nº 306/2004 da ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária).

### **3.1.4 Cálculo de dose e preparo da amostra**

Os carotenóides (luteína/X6250 e beta-caroteno/C4582) isolados foram obtidos da Sigma. A couve foi fornecida por um produtor orgânico certificado e o suco desta hortaliça foi obtido através do uso de um processador de alimentos. O suco verde comercial foi adquirido da empresa Vale do Thitamá, e para todos os sucos foi utilizado o volume de administração de 0,1mL/10g de peso corporal. A dose de luteína utilizada no estudo foi de 0,2mg/kg de peso corporal como descrito previamente por Serpeloni *et al.* (2010), e de beta-caroteno foi utilizada 2,5mg/kg de peso corporal, como descrito previamente por Aissa *et al.* (2012).

## **3.2 DESENHO EXPERIMENTAL**

O experimento foi realizado através da administração de luteína, beta-caroteno, água e dos sucos vegetais por meio de gavagem (volume de 0,1mL/10g de peso corporal) e dos agentes alquilantes MMS (40mg/kg de peso corporal) e CP (25mg/kg de peso corporal) por via intraperitoneal. O desenho experimental está ilustrado na tabela1 abaixo:

Tabela 1: Desenho Experimental: horário de administração dos compostos, coleta de sangue e morte dos animais.

Procedimentos	Tempo de exposição/ administração		
	0h	24h	48h
<b>Controle</b>	Tratamento:		
	1.Água	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de água	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	2.Luteína isolada (LT)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de LT	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	3.β-caroteno isoldado (BC)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de BC	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	4.Suco de Couve (SCV)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de SCV	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
<b>Pré-tratamento</b>	5.Suco Verde Comercial (SVC)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de SVC	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	6.Luteína isolada (LT)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue Administração de MMS	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	7.Luteína isolada (LT)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue Administração de CP	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	8.β-caroteno isoldado (BC)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue Administração de MMS	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte

	9.β-caroteno isoldado (BC)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue Administração de CP	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	10.Suco de Couve (SCV)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue Administração de MMS	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	11.Suco de Couve (SCV)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue Administração de CP	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	12.Suco Verde Comercial (SVC)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue Administração de MMS	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	13.Suco Verde Comercial (SVC)	1 <sup>a</sup> coleta de sangue Administração de CP	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
<b>Pós-tratamento</b>	14.MMS	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de LT	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	15.MMS	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de BC	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	16.MMS	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de SCV	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	17.MMS	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de SVC	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte
	18.CP	1 <sup>a</sup> coleta de sangue 2 <sup>a</sup> administração de LT	2 <sup>a</sup> coleta de sangue Morte

	19.CP	1ª coleta de sangue 2ª administração de BC	2ª coleta de sangue Morte
	20.CP	1ª coleta de sangue 2ª administração de SCV	2ª coleta de sangue Morte
	21.CP	1ª coleta de sangue 2ª administração de SVC	2ª coleta de sangue Morte
<b>Agentes Alquilantes</b>	22.Metil Metanosulfonato (MMS)	-	Morte
	23.Ciclofosfamida (CP)	-	

---

### 3.3 COLETA DO MATERIAL E CUIDADO COM OS ANIMAIS

Após os tratamentos foram coletadas amostras de sangue de todos os animais através de incisão na extremidade da cauda, retirando-se sangue da veia caudal com auxílio de uma micropipeta (10 $\mu$ L) para a realização do Ensaio Cometa nos tempos 24h e 48h.

Posteriormente a cada coleta de sangue, foi administrado analgésico em gotas na água (Dipirona Sódica 30 gotas em 300mL), com o objetivo de alívio da dor que eventualmente possa ter sido causada pelo experimento. Também a fim de evitar sangramento e dor, foi aplicado spray antisséptico e analgésico na cauda dos animais após o corte.

### 3.4. ENSAIO COMETA IN VIVO

O emprego do Ensaio Cometa neste estudo seguiu os protocolos internacionais já estabelecidos para a sua realização (Tice et al, 2000). O preparo das lâminas foi realizado a partir da mistura de 5 $\mu$ L de sangue com 90 $\mu$ L de agarose Low Melting Point (0,75%). Colocou-se então, tal mistura (células/agarose) em lâmina de microscópio pré-revestida com 300 $\mu$ L de agarose normal (1,5%), cobrindo posteriormente com uma lamínula e levando, então, à geladeira por aproximadamente 5 minutos para solidificação. Logo após, as lamínulas foram cuidadosamente retiradas e as lâminas imersas em tampão de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA e 10mM Tris, pH 10,0-10,5, com adição na hora do uso de 1% de Triton X – 100 e 10% de DMSO) a 4°C por um período mínimo de 1 hora e máximo de 2 semanas. Após este período, as lâminas foram incubadas em tampão alcalino (300mM NaOH e 1mM EDTA, pH>13) por 20 minutos para que ocorra o desenovelamento do DNA. Realizou-se a corrida eletroforética a 25v e 300mA por 15 minutos. Todas as etapas ocorreram sob luz amarela indireta. Posteriormente as lâminas foram neutralizadas com 0,4M Tris (pH 7,5) e, ao final, o DNA foi corado com brometo de etídio (20 $\mu$ g/mL) para análise em microscópio de fluorescência com aumento de 400x.

Foi realizada avaliação de 100 células por indivíduo (50 células em cada lâmina duplicada). Tais células foram avaliadas visualmente, sendo classificadas em cinco classes, de acordo com o tamanho da cauda, sendo a classificação para ausência de cauda, até 4 para o comprimento máximo (Collins et al 1997). Desta forma, tem-se um Índice de Danos (ID) para cada grupo variando de zero (100 X 0 = 0;

100 células observadas completamente sem danos) a 400 (100 X 4 = 400; 100 células observadas com dano máximo). Calcula-se a frequência de danos (FD em %) em cada amostra com base no número de células com cauda versus o número de células sem cauda. São utilizados controles negativos e positivos para cada teste de eletroforese a fim de assegurar a confiabilidade do procedimento.

### 3.5 CLAE (CROMATOGRAFIA LÍQUIDA DE ALTA EFICIÊNCIA)

#### 3.5.1 Extração e quantificação de carotenóides

As amostras foram preparadas segundo Aman *et al.* (2005), com modificações. As amostras (5 mL) foram misturadas em 5 mL de solução hexano:acetona (50:50, v/v), contendo  $100\text{mg.L}^{-1}$  de BHT (butil-hidroxi-tolueno). Foram mantidas em repouso (1 hora) em câmara escura, centrifugadas (3000 rpm, Centribio) e o solvente evaporado sob fluxo de  $\text{N}_2$  gasoso. O extrato recuperado foi ressuspensão em 5mL de hexano e submetidas à saponificação.

#### 3.5.2 Saponificação

A saponificação foi realizada através da adição de 100  $\mu\text{L}$  da solução metanólica de hidróxido de potássio 10% a 1 mL de extrato, durante três horas, a temperatura ambiente e em local protegido da luz. Após este período, as amostras foram lavadas em funil de separação (por quatro vezes com água ultrapura). A fração remanescente foi transferida para frasco âmbar, seguido da remoção do solvente sob fluxo de  $\text{N}_2$  gasoso e ressuspensão em 10 $\mu\text{L}$  de hexano para ser analisada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE).

#### 3.5.3 Detecção de carotenóides por CLAE

Alíquotas de 10  $\mu\text{L}$  de cada amostra foram analisadas em cromatógrafo líquido (Shimzadu LC – 10A), equipado com coluna de fase reversa  $\text{C}_{18}$  (Vydac 201TP54, 25 cm x 4,6 mm $\varnothing$  interno) e pré-coluna (Vydac 218GK54, 5  $\mu\text{m}$ ) e detector espectrofotométrico UV-Vis operando em 450 nm. A eluição utilizou metanol: acetonitrila (90:10, v/v) como fase móvel, fluxo de 1  $\text{mL.min}^{-1}$ . A identificação dos compostos de interesse foi realizada através de comparação com os tempos de retenção dos compostos padrões (luteína, zeaxantina,  $\beta$ -

caroteno, Sigma), sob as mesmas condições experimentais. A quantificação dos carotenóides foi feita utilizando-se curva padrão externa de luteína (2,5 a 50  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  -  $r^2 = 0,9952$ ;  $y = 7044x$ ) e  $\beta$ -caroteno (0,01 a 5  $\mu\text{g.mL}^{-1}$  -  $r^2 = 0,9947$ ;  $y = 1019x$ ) e considerou a área dos picos de interesse para efeito dos cálculos de concentração, sendo que os valores apresentados correspondem à média de 3 injeções por amostra. A concentração de carotenóides foi expressa em  $\mu\text{g}$  por mL de suco.

### 3.6 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

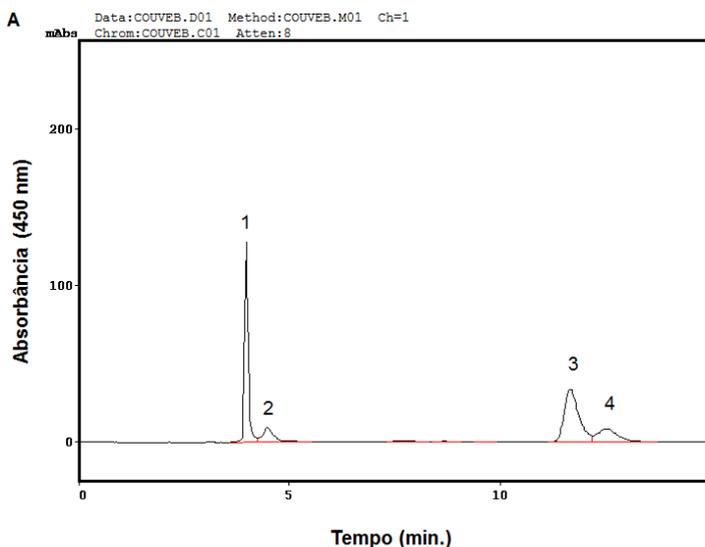
A normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste Kolmogorov-Smirnov. As análises estatísticas para Índice de Dano e Frequência de Dano foram feitas através de análise de variância de uma via (ANOVA) e quando o teste apresentou diferença entre os grupos foi aplicado o teste post-hoc de Tukey para as avaliações de genotoxicidade. Em caso de dados não-paramétricos foi utilizado o teste Kruskal-Wallis usando o teste Dunn como post hoc. O teste *t*-Student foi utilizado para se fazer a comparação dos parâmetros com distribuição normal em relação às comparações de pré e pós-tratamento. No caso de dados não-paramétricos foi utilizado o teste *U* de Wilcoxon-Mann-Whitney. Uma diferença de  $P < 0,05$  foi considerada estatisticamente significativa. O pacote estatístico utilizado foi o BioEstat 5.0.

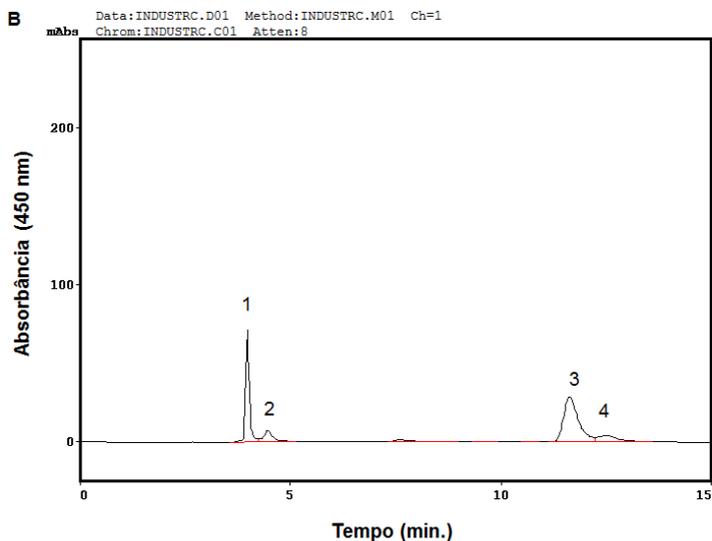
## 4 RESULTADOS

### 4.1 ANÁLISE QUANTITATIVA E QUALITATIVA DE CAROTENÓIDES POR CLAE

A análise cromatográfica visando a identificação e quantificação dos carotenóides revelou ser o isômero *trans* do  $\beta$ -caroteno predominante nos sucos analisados, sendo possível também a detecção do isômero *cis* do  $\beta$ -caroteno e das xantofilas luteína e zeaxantina (Figura 3).

Figura 3: Perfil cromatográfico de carotenóides (CLAE, 450 nm) do extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de: A - suco de couve (02/2012); B - suco verde comercial (02/2012). Picos: 1 - luteína; 2 - zeaxantina livre; 3 -*trans*- $\beta$ -caroteno; 4 - *cis*- $\beta$ -caroteno.





Fonte: Do autor

Após análise dos cromatogramas constatou-se que não houve diferença de concentrações dos carotenóides entre os sucos analisados, como pode ser observado na tabela II.

Tabela 2: Concentração dos carotenóides ( $\mu\text{g/mL}$  - massa seca) determinada por CLAE para o extrato organossolvente (hexano:acetona:BHT) de suco de couve e suco comercial. Os valores apresentados correspondem à média de três injeções ( $10 \mu\text{L}$ )  $\pm$  desvio padrão.

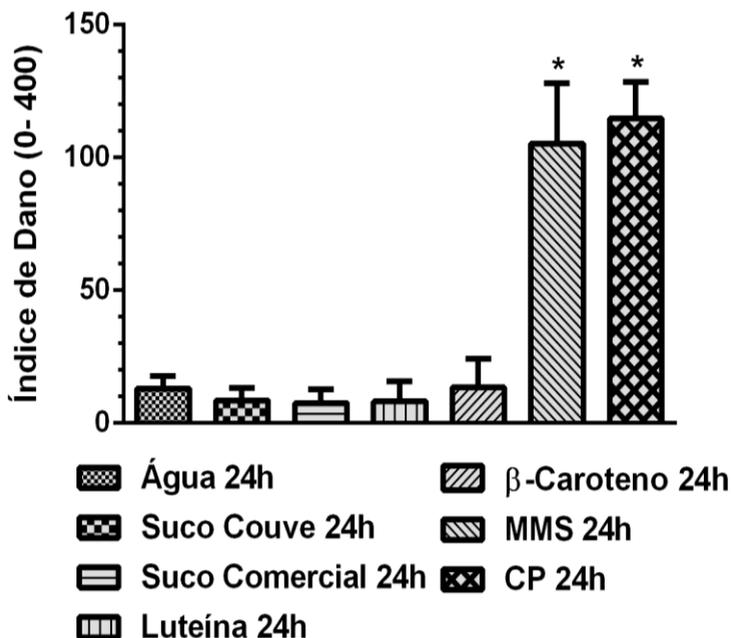
Carotenóides	Concentração ( $\mu\text{g/mL}$ )	
	Suco de Couve	Suco Comercial
<b>Luteína</b>	$61,22 \pm 14,44$	$67,99 \pm 4,04$
<b>Zeaxantina</b>	$21,36 \pm 3,41$	$16,30 \pm 1,43$
<b><i>trans</i>-<math>\beta</math>-caroteno</b>	$566,77 \pm 86,25$	$727,1 \pm 2$
<b><i>cis</i>-<math>\beta</math>-caroteno</b>	$262,24 \pm 44,61$	$51,00 \pm 5$
		14,18

Fonte: Do autor

#### 4.2 ANÁLISE DA GENOTOXICIDADE DO SUCO NATURAL DE COUVE, SUCO VERDE COMERCIAL, LUTEÍNA E BETA-CAROTENO ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA

Neste trabalho foram avaliados danos causados em DNA nas células sanguíneas de camundongos expostos a agentes mutagênicos (CP e MMS), suco natural de couve, suco verde comercial, luteína na dose de  $0,2\text{mg/kg}$  de peso corporal, beta-caroteno na dose de  $2,5\text{mg/kg}$  de peso corporal, e água. A figura 4 mostra os resultados obtidos em 24h de tratamento com todas as substâncias testadas no experimento.

Figura 4: Índice de dano em DNA induzido por água, suco natural de couve, suco verde comercial, luteína na dose de 0,2mg/kg de peso corporal,  $\beta$ -caroteno na dose de 2,5mg/kg de peso corporal e pelos agentes alquilantes metil metanosulfonato (MMS) e ciclofosfamida (CP), avaliados através do Ensaio Cometa em leucócitos de sangue periférico. \*Valores significantes em relação a todos os outros grupos tratados ( $P < 0,01$ , ANOVA, Tukey).



Fonte: Do autor

A avaliação dos danos de DNA nas células sanguíneas de camundongos demonstrou baixos valores de índice de dano (ID) nos animais tratados com água, suco natural de couve, suco verde comercial, luteína e beta-caroteno, e danos significativamente elevados nos controles positivos (MMS e CP) após 24 horas de exposição ( $P < 0,01$ , ANOVA, Tukey). A média dos valores de ID noDNA do grupo que recebeu água foi de 13, do grupo que recebeu suco de couve foi 8,5, do grupo que recebeu suco verde comercial foi de 7,6, do grupo que recebeu luteína foi de 8,1 e do grupo que recebeu beta-caroteno foi de

13,5. Para os agentes alquilantes MMS e CP as medias foram de 105,3 e 114,8 respectivamente.

Quando avaliados os valores de frequência de dano (FD), um outro parâmetro de análise do Ensaio Cometa que considera somente a porcentagem de células danificadas, pode-se observar resultados semelhantes aos encontrados para ID, com comparação significativa entre os grupos controle positivo e os grupos tratados com os compostos testados no estudo ( $P < 0,01$ , ANOVA, Tukey). A média de FD noDNA do grupo que recebeu água foi de 9,66, do grupo que recebeu suco de couve foi 5,55, do grupo que recebeu suco verde comercial foi de 5,05, do grupo que recebeu luteína foi de 5,27 e do grupo que recebeu beta-caroteno foi de 7,94. Para os agentes alquilantes MMS e CP as médias foram de 40,83 e 43,56 respectivamente.

#### 4.3 ANÁLISES DA ANTIGENOTOXICIDADE DO SUCO NATURAL DE COUVE, SUCO VERDE COMERCIAL, LUTEÍNA E BETA-CAROTENO ATRAVÉS DO ENSAIO COMETA

Após administrar nos camundongos água, suco de couve, suco verde comercial, luteína e beta-caroteno como pré-tratamento e pós-tratamento aos agentes alquilantes, comparados respectivamente em 24h e 48h, foram obtidos os resultados descritos a seguir.

O grupo que recebeu luteína como pré-tratamento ao agente alquilante MMS apresentou uma redução de 18,5% no ID ( $P < 0,01$ / Teste *U*) e de 5,2% na FD ( $P < 0,2$ / Teste *U*) em 24h (Tabela III/ Figura 5A). Para aqueles animais que receberam CP em 24h houve uma redução de 23,7% ( $P < 0,0001$ / Teste *U*) no ID, e 19,27% ( $P < 0,0002$ / Teste *U*) na FD (Tabela III/ Figura 6A). Quando o mesmo carotenóide foi administrado como pós-tratamento aos agentes alquilantes, este proporcionou uma redução de 28% no ID ( $P < 0,0001$ / Teste *t*) e de 22,1% na FD ( $P < 0,0001$ / Teste *t*) em relação ao grupo MMS (Tabela III/ Figura 5A), e de 34% no ID ( $P < 0,0001$ / Teste *t*) e de 23,23% na FD ( $P < 0,0001$ / Teste *t*) em relação à CP (Tabela III/ Figura 6A).

O pré-tratamento com beta-caroteno mostrou uma redução de 24,6% ( $P < 0,001$ / Teste *U*) no ID e de 8,1% ( $P < 0,1$ / Teste *U*) na FD no grupo que recebeu MMS (Tabela IV/ Figura 5B), diferença que mostrou redução, mas que não foi significativa. Em contrapartida, o grupo que recebeu CP como pré-tratamento apresentou 32% ( $P < 0,0001$ / Teste *U*) de redução no ID e de 19,2% ( $P < 0,0001$ / Teste *U*) na FD (Tabela IV/

Figura 6B). Já nos grupos pós-tratados com beta-caroteno a redução no ID foi de 27% ( $P < 0,01$ / Teste  $t$ ), e na FD foi de 16,58% ( $P < 0,0002$ / Teste  $t$ ) no grupo que recebeu MMS (Tabela IV/ Figura 5B), e no grupo que recebeu CP observou-se uma redução de 34% ( $P < 0,0001$ / Teste  $t$ ) no ID e de 24,13% ( $P < 0,0001$ / Teste  $t$ ) na FD (Tabela IV/ Figura 6B).

Quando o nível de danos no DNA nas células dos camundongos tratados com MMS e CP e amostrados em 24 horas foi comparado com o grupo pré-tratado com suco natural de couve, observou-se que este foi capaz de reduzir ID em 50,55% ( $P < 0,001$ / Teste  $U$ ) e em 32,6% na FD ( $P < 0,0001$ / Teste  $U$ ) no grupo exposto ao MMS (Tabela V/ Figura 5C). Já no grupo exposto a CP houve uma redução de 54,52% no ID ( $P < 0,001$ / Teste  $U$ ) e de 40,71% na FD ( $P < 0,0001$ / Teste  $U$ ) (Tabela V/ Figura 6C). O pós-tratamento com o suco natural de couve induziu uma diferença significativa nos danos ao DNA de células sanguíneas de camundongos para ambos os agentes alquilantes tanto para ID quanto para FD, mostrando uma redução de 44% no ID ( $P < 0,0001$ / Teste  $t$ ) e de 34,55% na FD ( $P < 0,0001$ / Teste  $t$ ) no grupo que recebeu MMS (Tabela V/ Figura 5C). Já no grupo que recebeu CP as porcentagens de redução de dano foram: 43,4 para ID ( $P < 0,0001$ , Teste  $t$ ) e 38,15 para FD ( $P < 0,0001$ / Teste  $t$ ) (Tabela V/ Figura 6C).

Adicionalmente, o pré-tratamento com o suco verde comercial mostrou nos animais que receberam MMS uma redução no ID de 54,9% ( $P < 0,0001$ / Teste  $U$ ) e na FD de 40,8% ( $P < 0,0002$ / Teste  $U$ ) (Tabela VI/ Figura 5D), e aqueles que receberam CP apresentaram uma redução de ID de 50,9% ( $P < 0,0001$ / Teste  $U$ ), e de FD de 38,78% ( $P < 0,0001$ / Teste  $U$ ) (Tabela VI/ Figura 6C). Já nos grupos que foram pós-tratados com suco verde comercial os resultados positivos de modulação de danos foram demonstrados com uma redução de 43,8% no ID ( $P < 0,0001$ / Teste  $t$ ) e de 34,11% na FD no grupo que recebeu MMS (Tabela VI/ Figura 5D), e de 39,1% no ID ( $P < 0,0001$ / Teste  $t$ ) e de 32,8% na FD ( $P < 0,0001$ / Teste  $t$ ) no grupo que recebeu CP (Tabela VI/ Figura 6D).

Figura 5: Índice de Dano avaliado pelo Ensaio Cometa em leucócitos de sangue periférico de camundongos tratados com metil metanosulfonato (MMS) e pré ou pós-tratados com luteína (LT) (A), beta-caroteno (BC) (B), suco de couve (SCV) (C), suco verde comercial (SVC) (D). <sup>a</sup> Valores estatisticamente significativos com  $P < 0,01$  (teste  $U$ ), <sup>b</sup>  $P < 0,0001$  (teste  $U$ ), <sup>c</sup>  $P < 0,001$  (teste  $U$ ).

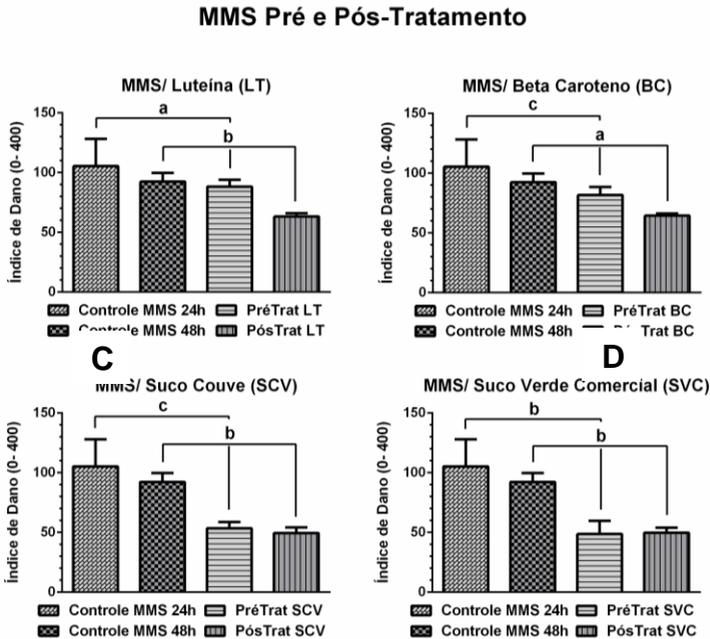


Figura 6: Índice de Dano avaliado pelo Ensaio Cometa em leucócitos de sangue periférico de camundongos tratados com ciclofosfamida (CP) e pré ou pós-tratados com luteína (LT) (A), beta-caroteno (BC) (B), suco de couve (SCV) (C), suco verde comercial (SVC) (D). <sup>a</sup> Valores estatisticamente significativos com  $P < 0,0001$  (teste *U*), <sup>b</sup>  $P < 0,0001$  (teste *t*), <sup>c</sup>  $P < 0,001$  (teste *U*).

### CP Pré e Pós-Tratamento

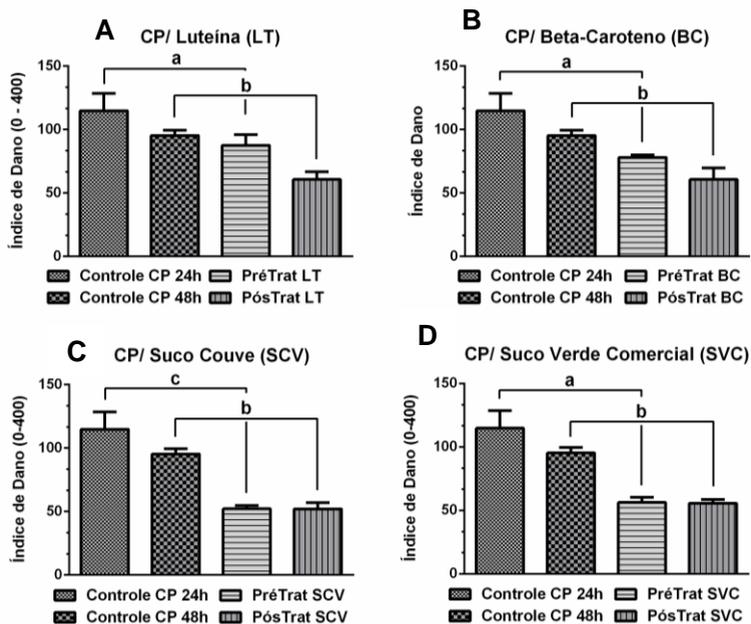


Tabela 3: Detecção de dano em DNA por Ensaio Cometa (FD e ID) em células sanguíneas de camundongos expostos a água, Luteína (LT), e/ou ciclofosfamida (CP) ou metil metanosulfonato (MMS) e amostrados em 24h (com e sem pré-tratamento com LT) ou 48h (com ou sem pós-tratamento com LT)

Substâncias	Doses (mg/Kg)	Horário <sup>a</sup> e parâmetros do ensaio cometa							
		24 h		48h		Pré- tratamento com LT <sup>b</sup>		Pós-tratamento comLT <sup>c</sup>	
<b>Índice de Dano (ID)</b>									
		<b>ID ± DP</b>	<i>n</i> <sup>d</sup>	<b>ID ± DP</b>	<i>N</i>	<b>ID ± DP</b>	<i>n</i>	<b>ID ± DP</b>	<i>n</i>
Água	-	13,00 ± 4,6	6	6,00 ± 4,7	-	-	-	-	-
LT	-	8,17 ± 7,6	18	9,50 ± 7,8	-	-	-	-	-
MMS	40,00	105,30 ± 22,7 <sup>e</sup>	30	92,33 ± 7,3	6	88,16 ± 5,8 <sup>f*</sup>	6	63,00 ± 2,7 <sup>g</sup>	6
CP	25,00	114,80 ± 13,7 <sup>e</sup>	30	95,33 ± 4,1	6	87,50 ± 8,5 <sup>f**</sup>	6	60,66 ± 6,0 <sup>g</sup>	6
<b>Frequência de Dano (FD)</b>									
		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>	
Água	-	9,66 ± 2,5	6	4,80 ± 2,7	-	-	-	-	-
LT	-	5,27 ± 4,8	18	5,66 ± 4,5	-	-	-	-	-
MMS	40,00	40,83 ± 6,0 <sup>e</sup>	30	36,16 ± 2,5	6	38,66 ± 2,4	6	28,16 ± 1,4 <sup>g</sup>	6
CP	25,00	43,56 ± 5,0 <sup>e</sup>	30	38,00 ± 2,6	6	35,16 ± 3,3 <sup>f</sup>	6	29,16 ± 2,7 <sup>g</sup>	6

ID = Índice de Dano; FD = Frequência de Dano; DP = Desvio Padrão.

<sup>a</sup>Para mais detalhes ver Tabela I.

<sup>b</sup> Grupos amostrados 24 h depois do tratamento com o agente alquilante.

<sup>c</sup> Grupos amostrados 48h depois do tratamento com o agente alquilante.

<sup>d</sup> n, Número de indivíduos obtidos pela soma dos experimentos independentes.

<sup>e</sup> Dados significantes em relação a água e luteína com  $P < 0,0001$

<sup>f</sup> Dados significantes em relação a ao grupo 24h com \* $P < 0,002$  \*\* $P < 0,0002$

<sup>g</sup> Dados significantes em relação a ao grupo com  $P < 0,0001$

Tabela 4: Detecção de dano em DNA por Ensaio Cometa (FD e ID) em células sanguíneas de camundongos expostos a água, Beta-caroteno (BC), e/ou ciclofosfamida (CP) ou metil metanosulfonato (MMS) e amostrados em 24h (com e sem pré-tratamento com BC) ou 48h (com ou sem pós-tratamento com BC)

Substâncias	Doses (mg/Kg)	Horário <sup>a</sup> e parâmetros do ensaio cometa							
		24h		48h		Pré- tratamento com BC <sup>b</sup>		Pós-tratamento com BC <sup>c</sup>	
<b>Índice de Dano (ID)</b>		<b>ID ± DP</b>	<i>n</i> <sup>d</sup>	<b>ID ± DP</b>	<i>N</i>	<b>ID ± DP</b>	<i>n</i>	<b>ID ± DP</b>	<i>n</i>
Água	-	13,00 ± 4,6	6	6,00 ± 4,7	-	-	-	-	-
BC	-	13,56 ± 10,7	18	15,67 ± 12,7	-	-	-	-	-
MMS	40,00	105,30 ± 22,7 <sup>e</sup>	30	92,33 ± 7,3	6	81,50 ± 6,83 <sup>f*</sup>	6	64,33 ± 1,8 <sup>g*</sup>	6
CP	25,00	114,80 ± 13,7 <sup>e</sup>	30	95,33 ± 4,1	6	78,00 ± 2 <sup>f**</sup>	6	60,66 ± 8,9 <sup>g***</sup>	6
<b>Frequência de Dano (FD)</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>	
Água	-	9,66 ± 2,5	6	4,80 ± 2,7	-	-	-	-	-
BC	-	7,94 ± 6,6	18	9,16 ± 7,7	-	-	-	-	-
MMS	40,00	40,83 ± 6 <sup>e</sup>	30	36,16 ± 2,5	6	37,50 ± 4,1	6	30,16 ± 1,3 <sup>g*</sup>	6
CP	25,00	43,56 ± 5 <sup>e</sup>	30	38,00 ± 2,6	6	35,16 ± 1,8 <sup>f**</sup>	6	28,83 ± 3,4 <sup>g***</sup>	6

ID = Índice de Dano; FD = Frequência de Dano; DP = Desvio Padrão.

<sup>a</sup>Para mais detalhes ver Tabela I.

<sup>b</sup>Grupos amostrados 24 h depois do tratamento com o agente alquilante.

<sup>c</sup> Grupos amostrados 48h depois do tratamento com o agente alquilante.

<sup>d</sup>n, Número de indivíduos obtidos pela soma dos experimentos independentes.

<sup>e</sup>Dados significantes em relação a água e beta-caroteno com  $P < 0,0001$

<sup>f</sup>Dados significantes em relação a ao grupo 24h com \* $P < 0,001$  \*\* $P < 0,0001$

<sup>g</sup>Dados significantes em relação a ao grupo com \* $P < 0,0005$  \*\* $P < 0,0001$

Tabela 5: Detecção de dano em DNA por Ensaio Cometa (FD e ID) em células sanguíneas de camundongos expostos a água, Suco Natural de Couve (SNC), e/ou ciclofosfamida (CP) ou metil metanosulfonato (MMS) e amostrados em 24h (com e sem pré-tratamento com SNC) ou 48h (com ou se pós-tratamento com SNC)

Substâncias	Doses (mg/Kg)	Horário <sup>a</sup> e parâmetros do ensaio cometa							
		24 h	48h			Pré-tratamento com SNC <sup>b</sup>	Pós-tratamento com SNC <sup>c</sup>		
<b>Índice de Dano (ID)</b>									
		<b>ID ± DP</b>	<i>n</i> <sup>d</sup>	<b>ID ± DP</b>	<i>N</i>	<b>ID ± DP</b>	<i>n</i>	<b>ID ± DP</b>	<i>n</i>
Água	-	13,00 ± 4,6 <sup>e</sup>	6	6,00 ± 4,7	-	-	-	-	-
SNC	-	8,50 ± 4,7	18	10,67 ± 5,5	-	-	-	-	-
MMS	40.00	105,30 ± 22,7 <sup>e</sup>	30	92,33 ± 7,3	6	53,50 ± 5,2 <sup>f**</sup>	6	49,50 ± 4,6 <sup>g</sup>	6
CP	25.00	114,80 ± 13,7 <sup>e</sup>	30	95,33 ± 4,1	6	52,16 ± 2,6 <sup>f*</sup>	6	52,00 ± 4,9 <sup>g</sup>	6
<b>Frequência de Dano (FD)</b>									
		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>	
Água	-	9,66 ± 2,5	6	4,80 ± 2,7	-	-	-	-	-
SNC	-	5,55 ± 3,0	18	5,16 ± 2,9	-	-	-	-	-
MMS	40.00	40,83 ± 6,0 <sup>e</sup>	30	36,16 ± 2,5	6	27,50 ± 3,6 <sup>f***</sup>	6	23,66 ± 1,6 <sup>g</sup>	6
CP	25.00	43,56 ± 5,0 <sup>e</sup>	30	38,00 ± 2,6	6	25,83 ± 2,9 <sup>f***</sup>	6	23,50 ± 2,3 <sup>g</sup>	6

ID = Índice de Dano; FD = Frequência de Dano; DP = Desvio Padrão.

<sup>a</sup>Para mais detalhes ver Tabela I.

<sup>b</sup>Grupos amostrados 24 h depois do tratamento com o agente alquilante.

<sup>c</sup>Grupos amostrados 48h depois do tratamento com o agente alquilante.

<sup>d</sup>n, Número de indivíduos obtidos pela soma dos experimentos independentes.

<sup>e</sup>Dados significantes em relação a água e suco natural de couve com  $P < 0,0001$

<sup>f</sup>Dados significantes em relação a ao grupo 24h com \* $P < 0,001$  \*\* $P < 0,0002$  \*\*\* $P < 0,0001$

<sup>g</sup>Dados significantes em relação a ao grupo com  $P < 0,0001$

Tabela 6: Detecção de dano em DNA por Ensaio Cometa (FD e ID) em células sanguíneas de camundongos expostos a água, Suco Verde Comercial (SVC), e/ou ciclofosfamida (CP) ou metil metanosulfonato (MMS) e amostrados em 24h (com e sem pré-tratamento com SVC) ou 48h (com ou sem pós-tratamento com SVC).

Substâncias	Doses (mg/Kg)	Horário <sup>s</sup> e parâmetros do ensaio cometa							
		24 h		48h		Pré- tratamento com SNC <sup>a</sup>		Pós-tratamento com SNC <sup>b</sup>	
<b>Índice de Dano (ID)</b>									
		<b>ID ± DP</b>	<i>n</i> <sup>d</sup>	<b>ID ± DP</b>	<i>N</i>	<b>ID ± DP</b>	<i>n</i>	<b>ID ± DP</b>	<i>n</i>
Água	-	13,00 ± 4,6	6	6,00 ± 4,7	-	-	-	-	-
SVC	-	7,61±5,1	18	8,33 ± 6,8	-	-	-	-	-
MMS	40,00	105,30 ± 22,7 <sup>e</sup>	30	92,33 ± 7,3 <sup>g</sup>	6	48,60 ± 11,0 <sup>f**</sup>	6	49,83 ± 4,1	6
CP	25,00	114,80 ± 13,7 <sup>e</sup>	30	95,33 ± 4,1 <sup>g</sup>	6	56,33 ± 3,9 <sup>f**</sup>	6	55,66 ± 3,0	6
<b>Frequência de Dano (FD)</b>									
		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>		<b>FD ± DP</b>	
Água	-	9,66 ± 2,5	6	4,80 ± 2,7	-	-	-	-	-
SVC	-	5,00 ± 3,4	18	5,50 ± 4,5	-	-	-	-	-
MMS	40,00	40,83 ± 6,0 <sup>e</sup>	30	36,16 ± 2,5	6	24,16 ± 8,1 <sup>f*</sup>	6	23,83 ± 2,7 <sup>g</sup>	6
CP	25,00	43,56 ± 5,0 <sup>e</sup>	30	38,00 ± 2,6	6	26,66 ± 2,3 <sup>f**</sup>	6	25,50 ± 1,8 <sup>g</sup>	6

ID = Índice de Dano; FD = Frequência de Dano; DP = Desvio Padrão.

<sup>a</sup>Para mais detalhes ver Tabela I.

<sup>b</sup>Grupos amostrados 24 h depois do tratamento com o agente alquilante.

<sup>c</sup>Grupos amostrados 48h depois do tratamento com o agente alquilante.

<sup>d</sup>n, Numero de indivíduos obtidos pela soma dos experimentos independentes.

<sup>e</sup>Dados significantes em relação a água e suco verde comercial com  $P < 0,0001$

<sup>f</sup>Dados significantes em relação a ao grupo 24h com \* $P < 0,00021$  \*\* $P < 0,0001$

<sup>g</sup>Dados significantes em relação a ao grupo com  $P < 0,0001$

## 5. DISCUSSÃO

Após a descoberta da presença não só de macro e micronutrientes na alimentação humana, como também de compostos bioativos, os estudos epidemiológicos passaram a relacionar a ingestão destes compostos com a redução dos riscos do surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, como doenças cardiovasculares, disfunções metabólicas e câncer (Minich, 2008; Sofi *et al.*, 2010).

São crescentes as evidências na literatura sobre os efeitos benéficos do uso destes compostos, em especial os carotenóides. Estes compostos não são essenciais à vida humana, mas sua deficiência gera uma diminuição da proteção antioxidante, e conseqüente desequilíbrio orgânico. Dessa forma, a dietoterapia deve visar minimizar estas deficiências, preconizando a introdução de vitaminas, minerais e compostos bioativos na matriz alimentar, pois estes têm comprovada ação benéfica à saúde humana, e o suco de couve surge como componente chave para suprir essa demanda. No entanto, há relatos que apontam estes micronutrientes e os compostos bioativos como genotóxicos ou mutagênicos, principalmente quando utilizados em excesso ou fora do contexto do alimento (Manach *et al.*, 2007; Bastos *et al.*, 2009; Cozzolino, 2009; Horst *et al.*, 2010; Yurtcut *et al.*, 2011; Gonçalves *et al.*, 2012).

Com base no conteúdo encontrado na literatura, que afirma um potencial antioxidante dos carotenóides, mas também os julga pró-oxidantes e genotóxicos, utilizamos os sucos de couve *in natura* e suco verde comercial para: 1) avaliar se os sucos e os carotenóides utilizados na pesquisa poderiam ser genotóxicos; 2) avaliar se os sucos e/ou os carotenóides poderiam modular a genotoxicidade induzida pelos agentes alquilantes, e demonstrarem efeitos diferentes entre os grupos tratados com os carotenóides e os grupos tratados com os sucos.

Para a avaliação da capacidade genotóxica/antigenotóxica dos carotenóides e dos sucos testados neste estudo, utilizamos o ensaio cometa em leucócitos de sangue periférico de camundongos. Esta técnica é amplamente usada para a detecção de efeitos genotóxicos/antigenotóxicos de substâncias, e comumente encontrada na literatura. A técnica do ensaio cometa alcalino (pH<13) que utilizamos, pode ser aplicada para a detecção de quebras de fita simples e dupla, sítio alcalilábeis e ligações cruzadas entre DNA-DNA e DNA-proteína (Fairbairn *et al.*, 1995).

Nos experimentos executados neste estudo para a análise da genotoxicidade pelo ensaio cometa, tanto os carotenóides isolados, como os sucos administrados causaram baixos índices de danos nas células sanguíneas dos animais tratados. Os valores foram semelhantes ao grupo controle negativo e bem abaixo dos valores encontrados nos grupos controle positivos. Esses resultados demonstram que os carotenóides administrados, o suco de couve *in natura* e o suco verde comercial não exerceram atividade genotóxica, além de comprovar a eficiência da técnica.

Resultados semelhantes foram citados por Gonçalves *et al.* (2012), que ao avaliar o potencial genotóxico e/ou antigenotóxico do extrato hidroalcoólico da *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. em diferentes células de camundongos, mostraram que nenhuma das concentrações utilizadas (500, 1000 e 2000mg/kg) teve efeito genotóxico avaliado pelo ensaio cometa, ou clastogênico avaliado pelo teste de micronúcleo.

Para a avaliação do potencial antigenotóxico dos compostos testados neste estudo, foram utilizados dois agentes alquilantes, MMS e CP. O metil metanosulfonato (MMS) é um agente mutagênico de ação direta que metila regiões nucleofílicas do DNA. A genotoxicidade deste agente é mediada por modificações de base, as quais enfraquecem as ligações N-glicosídicas, levando a depurinação/depurimidação das fitas de DNA e favorecendo o surgimento de sítios álcali-lábeis (sítios AP). A remoção destes sítios AP pelas AP endonucleases cliva o DNA adjacente a esses sítios e gera quebras na molécula de DNA. Em contrapartida, a ciclofosfamida (CP) é um agente alquilante bifuncional de ação indireta, dessa forma, sua genotoxicidade é mediada por seus metabólitos. Uma vez ativada, pode induzir a formação de ligações (crosslinks) DNA-DNA e DNA-proteína, bem como adutos de DNA e alquilações em N7G. Este agente tem ainda a habilidade de gerar radicais livres que causam danos celulares endoteliais e epiteliais (Horváthova *et al.*, 1998; Boiteux e Guillet, 2004).

Os resultados do presente trabalho para as avaliações de antigenotoxicidade mostraram uma redução nos índices e frequências de danos induzidos por ambos os agentes alquilantes por ambos os sucos e compostos ativos isolados. No que se refere ao pré-tratamento com a luteína e o beta-caroteno, observou-se uma redução de danos ao DNA nos grupos tratados com MMS de 18,5% e 24,6%, respectivamente. Proteção esta que foi mais acentuada, mesmo sem diferença estatística, nos grupos tratados com os carotenóides em relação à CP,

onde observou-se 23,7% de diminuição de dano no grupo pré-tratado com luteína, e 32% no grupo pré-tratado com beta-caroteno. Também se pode observar uma maior proteção e efeito moderador de danos nos grupos tratados com beta-caroteno.

Quanto a modulação de dano propiciado pelos carotenóides, observamos uma redução de 28% no grupo que recebeu luteína, e 27% no grupo que recebeu beta-caroteno, ambos tratados com MMS. Nos grupos tratados com CP, a redução de dano foi de 34% para os dois carotenóides. Estes resultados mostram que os carotenóides utilizados neste estudo possuem um efeito protetor e modulatório sobre as células dos animais, podendo ser considerados possíveis agentes antígenotóxicos. Estes achados se assemelham aos resultados de Seperloni *et al.*(2010), que obteve efeito antígenotóxico, e além disso, observou níveis aumentados de glutathione nos animais tratados com luteína, o que afirma o potencial antioxidante deste carotenóide.

Quando avaliamos os achados da literatura sobre o beta-caroteno, encontramos resultados semelhantes aos nossos, como os citados por Reddy *et al.*(2006) e Salvadori *et al.* (1992), mas também que contradizem os nossos achados, como os citados por Yurtcu *et al.*(2011), que ao avaliar os efeitos protetores do beta-caroteno em uma linhagem de células de carcinoma hepatocelular humano, observaram um aumento da ocorrência de dano em DNA nas células tratadas com o carotenóide, além de um aumento na peroxidação lipídica.

Do mesmo modo, van Helden *et al.*(2009) avaliaram os efeitos do beta-caroteno e de seus metabólitos na genotoxicidade induzida por neutrófilos, e observaram que os metabólitos do beta-caroteno apresentaram capacidade de inibir a enzima mieloperoxidase em combinação com o aumento da formação de radical hidroxila por induzir a reação de Fenton. É importante ressaltar sobre os resultados controversos relacionados à ação do beta-caroteno, onde acredita-se que *in vivo* este carotenóide provavelmente atue em conjunto com outros carotenóides e outros constituintes alimentares. Afirmação esta que ressalta o benefício da ingestão deste composto bioativo no alimento fonte ao invés de suplementos com os carotenóides isolados (Rios *et al.*, 2009).

As porcentagens de redução de dano de DNA obtidas no nosso trabalho a partir do tratamento com os carotenóides foram inferiores aos achados nos grupos tratados com os sucos. Ao avaliarmos a capacidade de proteção dos sucos perante o agente alquilante MMS, o grupo tratado com o suco de couve apresentou uma redução de 50,55% de dano, e o

grupo que recebeu suco verde comercial apresentou uma redução de 54,99%, nos mostrando uma maior eficácia de proteção dos sucos, quando comparados aos carotenóides isolados, porém não significativa. Essa tendência se repetiu nos grupos tratados com CP, já que a redução de dano no grupo que recebeu suco de couve foi de 54,52%, e no grupo que recebeu suco verde comercial foi de 50,9%, resultados que se assemelham aos de Gonçalves *et al.* (2012), que obteve efetiva ação antígeno-tóxica do extrato hidroalcoólico da couve, no pré-tratamento à doxorubicina.

Quando avaliamos a capacidade de modulação dos danos no pós-tratamento com os sucos de couve e verde comercial, observamos novamente uma maior eficácia na redução de danos, quando comparado com os carotenóides testados. O grupo que recebeu suco de couve como pós-tratamento ao MMS apresentou uma redução de dano de 44%, valor que se assemelhou ao grupo pós-tratado com suco verde comercial, que foi de 43,8%. Ao utilizarmos o agente alquilante CP, obtivemos reduções de dano de 43,4% e 39% para os grupos que receberam suco de couve e suco verde comercial, respectivamente. Outros autores já afirmaram a capacidade de redução de dano em DNA da couve (*B.oleracea*. var.*acephala*), como Horst *et al.*(2010), que ao estudar o efeito do extrato aquoso de couve e repolho em ratos que foram submetidos a um modelo animal de hepatocarcinoma, encontraram uma redução de dano em DNA no fígado destes animais, além de uma maior concentração de luteína neste órgão. Do mesmo modo, Gonçalves *et al.* (2012) observaram atividade antígeno-tóxica nas diferentes concentrações de extrato hidroalcoólico de couve utilizado em seu estudo.

Há dois processos maiores que classificam os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos: desmutagênese e bio-antimutagênese. A desmutagênese ocorre quando os agentes protetores, ou antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, proporcionando uma inativação química ou enzimática, associado à inibição da ativação metabólica de pró-mutagênicos ou sequestrando moléculas reativas. Já na bio-antimutagênese, há a atuação dos antimutagênicos sobre o processo que leva a indução de mutações, ou no reparo de lesões causadas ao DNA. Independente do sistema-teste, os agentes antimutagênicos usados como pré-tratamento podem atuar como desmutagênicos, e sugere-se que os agentes antimutagênicos no pós-tratamento atuem pelo mecanismo de

bio-antimutagenese, estando este relacionado ao processo de reparo das mutações (Kada *et al.*, 1978).

Baseado nos trabalhos de Miyaji (2001) e Kuroda *et al* (1992), nossa hipótese é de que os sucos de couve possam ter induzido algumas enzimas, as quais atuaram como inativadoras metabólicas dos agentes mutagênicos, tendo possivelmente ocorrido o mecanismo de bioantimutagênese. Outra hipótese é de que os componentes celulares dos sucos possam ter capturado os agentes alquilantes ou mesmo, o próprio extrato tê-los inativados, neste caso, ocorrendo o mecanismo de desmutagênese.

Ao compararmos os tratamentos aplicados, observamos uma maior eficácia no efeito modulatório de danos ao DNA induzida pelos agentes alquilantes dos sucos de couve e suco verde comercial, o que sugere a importância de outras substâncias presentes nos sucos, tais como vitaminas, flavonoides e minerais. Por exemplo, Serpeloni *et al.* (2011) avaliaram os efeitos protetores da clorofila, substância presente nos sucos de folhas verdes, em associação com outros carotenóides, e obtiveram um aumento da proteção antioxidante. Achados que ressaltam a importância da associação destes compostos isolados para a obtenção de um melhor efeito biológico, condição encontrada no suco de couve e no suco verde comercial.

A CLAE foi utilizada como ferramenta para detectar, quantificar e principalmente observar a variação de carotenóides entre os sucos de couve e verde comercial utilizados neste estudo, onde foi observada a presença predominante de luteína e beta-caroteno nos sucos utilizados neste estudo. A atuação protetora dos carotenóides é amplamente relacionada à sua capacidade antioxidante, pois devido a sua característica estrutural podem atuar desativando espécies reativas de oxigênio e sequestrando radicais livres. Essa desativação pode ser física, ocorrendo através da transferência de energia de excitação do oxigênio singlete para o carotenóide, resultando em formação de oxigênio no seu estado fundamental e estado triplete excitado do carotenóide. Consequentemente, a energia do estado triplete excitado do carotenóide dissipada através de interações rotacionais e vibracionais entre o carotenóide e o solvente, para recuperar o estado fundamental do mesmo, sem ocorrer degradação. A desativação química ocorre, por exemplo, quando o ânion superóxido é reduzido pelo beta-caroteno devido a capacidade do carotenóide em doar elétrons para espécies reativas de oxigênio (Edger *et al.*, 1997; Krinsky, 2001; Young e Lowe, 2001).

Observando os resultados obtidos neste estudo, podemos concluir que os carotenóides utilizados apresentaram efeito protetor e modulatório aos danos genotóxicos causados pelos agentes alquilantes. Porém, a redução nos danos em DNA proporcionada pelo pré e pós-tratamento com os sucos de couve e verde comercial foi expressivamente maior que a obtida com os carotenóides isolados, demonstrando que o efeito protetivo é obtido devido à mistura complexa de compostos bioativos, fibras, e outros nutrientes encontrados nos sucos. Ao avaliarmos os resultados contraditórios encontrados na literatura sobre o uso dos carotenóides isolados, nos questionamos sobre a segurança da aplicação dessas substâncias como tratamento, e conseqüentemente, nos certificamos da maior segurança e eficácia dessas substâncias na matriz alimentar, neste caso, nos sucos de couve e verde comercial, e confirmamos a importância do consumo de vegetais diariamente na dieta humana.

## REFERÊNCIAS

- Aissa AF, Bianchi ML, Ribeiro JC, Hernandez LC, de Faria AF, Mercadante AZ, Antunes LM. Comparative study of  $\beta$ -carotene and microencapsulated  $\beta$ -carotene: evaluation of their genotoxic and antigenotoxic effects. *Food Chem Toxicol.* 50(5):1418-24. 2012.
- Albertini RJ, Anderson D, Douglas GR, Hagmar L, Hemminki K, Merlo F, Natarajan AT, Norppa H, Shuker DEG, Tice R, Waters MD, Aitio A. IPCS guidelines for the monitoring of genotoxic effects of carcinogens in humans. *Mutat Res* 463: 111-172. 2000.
- Ambrósio CLB, Campos FACS, Faro ZP. Carotenoids as an alternative against hypovitaminosis A. *Rev Nutr Camp* 19(2): 233-243. 2006.
- Antunes LMG, Araújo MCP. Mutagenicity and antimutagenicity of the main food colorings. *Rev Nutr.* 13: 81-88. 2000.
- ANVISA - Resoluções 18 e 19 de 30 de abril, 1999. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/legis/especifica/regutec.htm>
- Assis MAA, Nahas MV. Aspectos motivacionais em programas de mudança de comportamento alimentar. *Rev Nutr Camp* 12(1): 33-41. 1999.
- Azqueta A, Collins AR. Carotenoids and DNA damage. *Mutat Res.* 1;733(1-2):4-13. 2012.
- Bastos DH, Rogero MM, Arêas JA. Effects of dietary bioactive compounds on obesity induced inflammation. *Arq Bras Endocrinol Metabol* 53(5):646-56. 2009.
- Brandi G, Schiavano GF, Zaffaroni N, de Marco C, Paiardini M, Cervasi B, Magnani M. Mechanisms of action and antiproliferative properties of Brassica oleracea juice in human breast cancer cell lines. *J Nutr.* 135(6):1503-9. 2005.
- Bramley PM. Regulation of carotenoid formation during tomato fruit ripening and development. *J. Exp. Bot.* 53: 2107-2113. 2002.
- Briviba K, Bub A, Moseneder J, Schwerdtle T, Hartwig A, Kulling S, Watzl B. No differences in DNA damage and antioxidant capacity between intervention groups of healthy, nonsmoking men receiving 2, 5, or 8 servings/day of vegetables and fruit. *Nutr. Cancer.* 60: 164-170. 2008.
- Boiteux S, Guillet M. Abasic sites in DNA: repair and biological consequences in *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA repair* 3: 1-12. 2004.

- Burlinson B, Tice RR, Speit G, Agurell E, Brendler-schaab SY, Collins AR, Escobar P, Honma M, Kumaravel TS, Nakajima M, Sasaki YF, Thybaud V, Uno Y, Vasquez M, Hartmann A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup. *Mutat Res* 627:31-35. 2007.
- CEASA - Catálogo Brasileiro de Hortaliças. Disponível em: <http://www.ceasa.gov.br/dados/publicacao/Catalogo%20hortalicas.pdf>
- Collins A, Dusinska M, Franklin M, Somorovska M, Petrovska H, Duthie S. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications. *Environ mol mutagen* 30: 139-46. 1997.
- Cotelle S, Féraud JF. Comet Assay in Genetic Ecotoxicology: A Review. *Environ Mol Mutagen*. 34: 246-255. 1999.
- Cozzolino, SMF. Biodisponibilidade de nutrientes. 2. ed., Barueri, SP: Manole, 2009. 992 p.
- deFlora S. Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. *Mutat Res*. 402(1-2): 151-8. 1998.
- Edge R, Mc Garvey DJ, Truscott TG. The carotenoids as anti-oxidants - a review. *J. Photochem. Photobiol. Biol. B*. 41: 189-200. 1997.
- Erdtmann, Bernardo. A genotoxicidade nossa de cada dia. In: SILVA, Juliana; ERDTMANN, Bernardo; HENRIQUES, João P.. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Alcance, 2003.
- Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat Res*. 339: 37-59. 1995.
- Ferguson LR. Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. *Mutat. Res.* 307: 395-410. 1994.
- Furr HC, Clark RM. Intestinal absorption and tissue distribution of carotenoids. *J. Nutr. Biochem*. 8: 364-77. 1997.
- Galinato MG, Niedzwiedzki D, Deal C, Birge RR, Frank HA. Cation radicals of xanthophylls. *Photosynth Res*. 94(1): 67-78. 2007.
- Garcia O, Mandina T, Lamadrid AI, Diaz A, Remigio A, Gonzalez Y. Sensitivity and variability of visual scoring in the comet assay: Results of an interlaboratory scoring exercise with the use of silver staining. *Mutat Res*. 556:25-34. 2004.
- Gonçalves ÁL, Lemos M, Niero R, de Andrade SF, Maistro EL. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic potential of *Brassica oleracea* L. var. *acephala* D.C. in different cells of mice. *J Ethnopharmacol*. 143(2):740-5. 2012.

- Hayashi M, Tice RR, Macgregor JT, Anderson D, Blakey DH, Kirschvolders M, Oleson FBJR, Pacchierotti F, Romagna F, Shimada H, Sutou S, Vannier B. *In vivo* rodent erythrocyte micronucleus assay. *Mutat Res* 312: 293-204. 1994.
- Horst MA, Ong TP, Jordão JR, Vannucchi H, Moreno FS, Lajolo FM. Water extracts of cabbage and kale inhibit ex vivo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced DNA damage but not rat hepatocarcinogenesis. *Braz J Med Biol Res.* 43(3): 242-248. 2010
- Horvathova E, Slamenova D, Hlincikova L, Mandal TK, Gabelova A, Collins AR. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay. *Mutat Res.* 409(3): 163-71. 1998.
- Jacobs DR, Tapsell LC. Food, not nutrients, is the fundamental unit in nutrition. *Nutr Rev.* 65(10):439-50. 2007
- Juchimiuk J, Gnys A, Maluszynska J. DNA damage induced by mutagens in plant and human cell nuclei in acellular comet assay. *Folia Histochem Cytobiol.*44(2):127-31. 2006.
- Kada T, Morita K, Inoue T. Anti-mutagenic action of vegetable factor(s) on the mutagenic principle of tryptophan pyrolysate. *Mutat Res.* 53(3): 351-353. 1978
- Kang MH, Park YK, Kim HY, Kim TS. Green vegetable drink consumption protects peripheral lymphocytes DNA damage in Korean smokers. *Biofactors.* 22(1-4):245-7. 2004.
- Khachik F, Spangler CJ, Smith JCJR, Canfield LM, Steck A, Pfander H. Identification, quantification, and relative concentrations of carotenoids and their metabolites in human milk and serum. *Anal Chem.*69(10):1873-81. 1997.
- Krinsky NI. Carotenoids as antioxidants. *Nutrition.*17: 815-817. 2001.
- Kuroda Y, Jain AK, Tezuka H, T. Kada. Antimutagenicity in cultured mammalian cells. *Mutat Res.* 267: 201-209. 1992.
- Lemos M, Santin JR, Junior LCK, Niero R, Andrade SF. Gastroprotective activity of hydroalcoholic extract obtained from the leaves of *Brassica oleracea* var. *acephala* DC in different animal models. *J Ethnopharmacol.* 138: 503 - 507. 2011.
- Liviero L, von Borstel RC. The 4th International Conference on Mechanisms of Antimutagenesis and Anticarcinogenesis: a summary. *Mutat Res.*19;350(1):287-93. 1996.
- Ma L, Dou HL, Wu YQ, Huang YM, Huang YB, Xu XR, Zou ZY, Lin XM. Lutein and zeaxanthin intake and the risk of age-related

- macular degeneration: a systematic review and meta-analysis. *Br J Nutr.* 8:1-10. 2011.
- Manach C, Williamson G, Morand C, Scalbert A, Rémésy C. Bioavailability and bioefficacy of polyphenols in humans. Review of 97 bioavailability studies. *Am J Clin Nutr.* 81: 230-242. 2005.
- Mascio P, Murphy ME, Sies H. Antioxidant defense systems: the role of carotenoids, tocopherols, and thiols. *Am J Clin Nutr.* 53:194-200. 1991.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF, Heddle JA. The in vivo Micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Protection Agency. Gene-Tox Program. *Mutat Res.* 239: 29-80. 1990.
- Miyaji CK. Avaliação da mutagenicidade e/ou antimutagenicidade de extratos do cogumelo Shiitake (*Lentinula edodes* (Berk.) Pegler) em cultura de células Hep-2 in vivo. 2001. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, – PR.
- Minich DM, Bland JS. Dietary management of the metabolic syndrome beyond macronutrients. *Nutr Rev.* 66:429-44. 2008.
- Paiva SAR, Russell RM. Beta-Carotene and Other Carotenoids as Antioxidants. *J Am Coll Nutr.* 18(5): 426 - 433. 1999.
- Parker RS. Absorption, metabolism and transport of carotenoids. *FASEB J.* 10(5): 542-51. 1996
- Pool-zobel BL, Muller H, Wollowski I, Rechkemmer G. Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. *Carcinogenesis.* 18(9):1847-1850. 1997.
- Reddy L, Odhav B, Bhoola K. Aflatoxin B1-induced toxicity in HepG2 cells inhibited by carotenoids: morphology, apoptosis and DNA damage. *Biol Chem.* 387(1):87-93. 2006.
- Ribeiro LR. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores *in vivo*. In: *Mutagênese Ambiental* (Ribeiro LR, Salvadori DMF, Marques EK, eds). Canoas, RS: Editora da Ulbra. 2003. p173-200.
- Rios AO, Antunes LMG, Bianchi MLP. Proteção de carotenoides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. *Alim. Nutr.* 20(2): 343-350. 2009.
- Rodriguez-amaya DB. Carotenoides y preparación de alimentos: La retención de los carotenoides provitamina A en alimentos preparados, procesados y almacenados. Campinas: USAID, 1999.
- Sabaté J. The contribution of vegetarian diets to health and disease: a paradigm shift? *Am J Clin Nutr.* 78(3): 502-507. 2003.

- Saffi J, Henriques JAP. Reparação de DNA em células eucarióticas. *Genética Toxicológica*. Da Silva, J., Erdtmann, B. & Henriques, J. A. P. Porto Alegre. 267-305. 2003.
- Salvadori DMF, Ribeiro LR, Oliveira MDM, Pereira CAB, Beçak W. The protective effect of  $\beta$ -carotene on genotoxicity induced by cyclophosphamide. *Mutat Res. Amsterdam*. 265 (2): 237-244. 1992.
- Santocono M, Zurria M, Berrettini M, Fedeli D, Falcioni G. Lutein, zeaxanthin and astaxanthin protect against DNA damage in SK-N-SH human neuroblastoma cells induced by reactive nitrogen species. *J photochphotobio b* 88: 1-10. 2007.
- Sasaki M, Yuki K, Kurihara T, Miyake S, Noda K, Kobayashi S, Ishida S, Tsubota K, Ozawa Y. Biological role of lutein in the light induced retinal degeneration. *J Nutr Biochem*. 23(5):423-9. 2012.
- Serpeloni JM, Grotto D, Mercadante AZ, Bianchi MLP, Antunes LMG. Lutein improves antioxidant defense in vivo and protects against DNA damage and chromosome instability induced by cisplatin. *Arch Toxicol* 84(10): 811-22. 2010.
- Serpeloni JM, Barcelos GR, Friedmann Angeli JP, Mercadante AZ, Lourdes Pires Bianchi M, Antunes LM. Dietary carotenoid lutein protects against DNA damage and alterations of the redox status induced by cisplatin in human derived HepG2 cells. *Toxicol In Vitro*. 26(2):288-94. 2012.
- Silva J, Erdtmann B, Henriques JAP. *Genética Toxicológica*. Porto Alegre: Editora alcance, 2003. 422p.
- Simões CMO, Mentz LA, Schenkel EP, Irgang BE, Stehmann JR. *Plantas da medicina popular no Rio Grande do Sul*. Porto Alegre: UFGRS, Brasil, 5: 124-125, 1998.
- Sofi F, Abbate R, Gensini GF, Casini A. Accruing evidence on benefits of adherence to the Mediterranean diet on health: an updated systematic review and meta-analysis. *Am J Clin Nutr*. 92(5):1189-96. 2010.
- Stahl W, Sies H.  $\beta$ -Carotene and other carotenoids in protection from sunlight. *Am J Clin Nutr*. 96(5):1179-84. 2012.
- Stringheta PC, Nachtigall AM, Oliveira TT, Ramos AM, Sant'ana HMP, Gonçalves MPJC. Luteína: propriedades antioxidantes e benefícios à saúde *Alim. Nutr*. 17: 229-238. 2006.
- Tanaka T, Shnimizu M, Moriwaki H. Cancer chemoprevention by carotenoids. *Molecules*. Mar 14;17(3):3202-42. 2012

- Tice RR, Agurell E, Anderson D, Burlinson B, Hartmann A, Kobayashi H, Miyamae Y, Rojas E, Ryu JC, Sasaki YF. Single Cell Gel/Comet Assay: Guidelines for *in vitro* and *in vivo* genetic toxicology testing. *Environ mol mutagen* 35: 306-221. 2000.
- Valverde M, Fortoul TI, Díaz-Barriga F, Mejía J, delCastillo ER. Genotoxicity induced in CD-1 mice by inhaled lead: differential organ response. *Mutagenesis*.17(1):55-61. 2002.
- van Helden YG, Keijer J, Knaapen AM, Heil SG, Briedé JJ, van Schooten FJ, Godschalk RW. Beta-carotene metabolites enhance inflammation-induced oxidative DNA damage in lung epithelial cells. *Free Radic. Biol. Med.* 46. 299–304. 2009
- Zhao X, Aldini G, Johnson RJ, Rasmussen H, Kraemer K, Woolf H, Musaeus N, Krinsky NI, Russell RM, Yeum KJ. Modification of lymphocyte DNA damage by carotenoid supplementation in postmenopausal women. *Am J Clin Nutr*83(1): 163-9. 2006.
- Young AJ, Lowe GM. Antioxidant and pro oxidant properties of carotenoids. *Arch. Biochem. Biophys.* 385: 20-27. 2001.
- Yurtcu E, Iseri OD, Sahin FI. Effects of ascorbic acid and beta-carotene on HepG2 human hepatocellular carcinoma cell line. *Mol. Biol. Rep.* 38. 4265–4272. 2011.