MÁRCIO FERNANDO MAGOSSO

***ACROCOMIA ACULEATA* PREVINE DANOS
TOXICOGENÉTICOS CAUSADOS PELO AGENTE
ANTITUMORAL CICLOFOSFAMIDA.**

CAMPO GRANDE

2015

MÁRCIO FERNANDO MAGOSSO

***Acrocomia aculeata* previne danos toxicogénicos causados pelo agente antitumoral ciclofosfamida.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

CAMPO GRANDE

2015

FOLHA DE APROVAÇÃO

MÁRCIO FERNANDO MAGOSSO

***Acrocomia aculeata* previne danos toxicogénicos causados pelo agente antitumoral ciclofosfamida.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste, da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Rodrigo Juliano Oliveira

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Profa. Dra. Maria de Fátima Cepa Matos

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS

Profa. Dra. Renata Matuo

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul – UFMS

DEDICO

Ao meu filho **Raul**,

Cujo sorriso é a maior fortaleza e o maior incentivo de um pai.

À **Gra**

*Pelo incentivo, meio truncado, às vezes, mas sempre verdadeiro.
Que tentou ler antes de todo mundo só pra dizer “tá bom!”.*

Aos Meus Pais, **Inocencia e João**

Apoio incondicional, pilares de paciência e dedicação.

À Minha Irmã, **Luciana**

Companheira de socorro e de risos.

Aos meus avós (in memoriam)

Angelim e Beatriz, Maria e Salvador

Que estão sempre comigo, mesmo tão longe...

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela existência, pela vida, pelo presente maravilhoso: minha Família e pelas dificuldades a serem superadas, pois elas nos tornam melhores.

Ao meu Filho **Paul**, tão pequenino e que me ensina tantas coisas, com o seu sorriso que me impele a continuar nas horas de fraquejo e o seu simples “Ahh!” quando vê alguma coisa nova que me faz lembrar que é preciso parar, que seja às vezes, para apreciar o momento e a vida com aqueles que amamos.

A minha Esposa, amiga e companheira, **Graciely**, pela coragem, pelo apoio, pela resolução de compartilhar a vida comigo, pelas palavras de incentivo, por certo raras, mas firmes e necessárias, que sempre me faz acreditar que é possível ser mais!

Aos meus Pais, **Inocencia** e **João**, pela vida, pelos ensinamentos, pelo caráter, pela paciência, pelos exemplos.

À minha Irmã **Luciana**, pelas brincadeiras, pelos risos, pelos socorros, pela “corujisse” com o sobrinho.

Aos meus Avós **Salvador** e **Maria**, **Angelim** e **Beatriz**, pelos exemplos, pelas histórias de vida, pela família, pelo copo de vinho e o macarrão ou a cerveja e a pipoca.

Aos meus Outros Pais **Antônia** e **Jorge** (in memoriam), pelo acolhimento em sua casa e suas vidas como se eu fosse seu filho, pelo carinho, pelos almoços de domingo.

Aos meus Outros Irmãos **Viviane** e **Juliano**, pela paciência, pelo companheirismo, pelo incentivo, pelo carinho e amizade, pelas “brejas” diferentes e, principalmente, pelas minhas sobrinhas.

Às minhas sobrinhas **Clara** e **Luísa**, pelo ensinamento que faltava em minha vida: ter um filho, e pelas gracinhas e risinhos que sempre alegam qualquer um.

Aos meus Outros Pais “Tia” **Maria** e **Noryoshi**, pela casa, pelo quartinho disponível, as guloseimas, pelo incentivo e apoio ao romance, pelo carinho e amizade.

Aos meus Amigos **Frajola** (vulgo Adriano), **Celbo** e **Turina**, pelo incentivo, pelo companheirismo, pela partilha de caminhos e experiências e pela amizade eterna.

Aos meus Amigos **Valmir**, **Tati**, **Samuel**, **Cássio** e toda a galera da **Escola Evangélica Avivamento Bíblico de Cassilândia**, pelo apoio, pela amizade, pela compreensão e pelo emprego que ajudou muito!

Às minhas Escudeiras do Laboratório **Wâmela** e **Beatriz**, pela amizade, pelos dias incontáveis de microscopia e pelos camundongos, sem vocês esse trabalho não seria possível.

Às minhas Anjos-da-Guarda **Sílvia**, pela ponderação e pelas palavras sempre coerentes de calma e bola pra frente; e **Vera** e **Áurea**, secretárias da pós pela paciência, pelos auxílios e incentivos.

Ao meu Professor Orientador **Rodrigo**, pela Oportunidade, paciência, perseverança, ensinamentos e disposição para trabalhar, “Vamos lá”!

Às minhas Amigas da faculdade **Áurea** e **Roseli**, pelo apoio, compreensão, incentivo e pelo microscópio!

Ao **Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento da Região Centro-Oeste** da FAMED, pela oportunidade.

Aos meus Caros **Alunos**, de ontem e de hoje, pelo incentivo, pela compreensão, pelo carinho e pela torcida.

Às minhas **Diretoras** e aos meus **Diretores**, às minhas **Coordenadoras** de hoje e de antes por sempre entenderem a frase “é do mestrado” e pelo incentivo.

À CAPES pelo apoio financeiro.

Ao **Paul Seixas**, que entre tantos ensinamentos e músicas, deixou pra nós uma que diz assim:

Veja!
Não diga que a canção
Está perdida
Tenha fé em Deus
Tenha fé na vida
Tente outra vez!
Beba! (Beba!)
Pois a água viva
Ainda tá na fonte
(Tente outra vez!)
Você tem dois pés
Para cruzar a ponte
Nada acabou!
Não! Não! Não!
Oh! Oh! Oh! Oh!
Tente!
Levante sua mão sedenta
E recomece a andar
Não pense
Que a cabeça aguenta
Se você parar
Não! Não! Não!
Não! Não! Não!

Há uma voz que canta
Uma voz que dança
Uma voz que gira
(Gira!)
Bailando no ar
Uh! Uh! Uh!
Queira! (Queira!)
Basta ser sincero
E desejar profundo
Você será capaz
De sacudir o mundo
Vai!
Tente outra vez!
Humrum!
Tente! (Tente!)
E não diga
Que a vitória está perdida
Se é de batalhas
Que se vive a vida
Han!
Tente outra vez!

*“O mais importante não é o que você sabe, o
mais importante é o que você faz com o que
você sabe”.*

Bruce Lee

RESUMO

MAGOSSO, Márcio Fernando. *Acrocomia aculeata* previne danos toxicogénicos causados pelo agente antitumoral ciclofosfamida. Dissertação (Mestrado em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro Oeste) – Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, MS.

Resumo

Acrocomia aculeata, rica em compostos antioxidantes, possui atividade anti-inflamatória, antidiabética e diurética, e no presente estudo foi avaliada quanto as suas capacidades (anti)genotóxicas, (anti)mutagênicas, imunomodulatórias e apoptóticas em associação com a ciclofosfamida. Foram utilizados 140 camundongos *Swiss* machos divididos nos grupos controles negativo, positivo (ciclofosfamida - 100 mg/kg); grupos que receberam somente os extratos da amêndoa (EA) e da polpa (EP) (3, 15 e 30 mg/kg) e grupos de tratamentos associados (extratos + ciclofosfamida) em protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento. Ambos Os extratos não são genotóxicos e nem mutagênicos. Os extratos são quimiopreventivos em todas as doses e protocolos testados e as porcentagens de redução de danos alcançaram 88,19% e 90,03% para o ensaio do cometa, e de até 69,73% e 70,93% para o ensaio do micronúcleo para EA e AP, respectivamente. Em relação aos ensaios de imunomodulação foi observado que os extratos possuem baixa atividade e no ensaio de apoptose verificou-se que os extratos reduzem a capacidade da ciclofosfamida causar apoptose nas células do fígado, baço e rim. Frente o exposto, infere-se que os extratos de *A. aculeata* podem compor alimentos funcionais/nutracêuticos com características quimiopreventivas. No entanto, não são fontes adequadas para a busca de coadjuvantes quimioterápicos, em especial, para o uso combinado com a agente antitumoral ciclofosfamida porque é capaz de diminuir a eficiência mutagênica e apoptótica do mesmo.

Palavras chave: quimioprevenção; bioantimutagênese; alimento funcional; nutracêutico; macaúba.

Magosso, Márcio Fernando. *Acrocomia aculeata* prevents toxicogenetic damage caused by the anti-tumor agent cyclophosphamide. Master's degree thesis (Graduate Program in Health and Development in the Midwestern Region) - Federal University of Mato Grosso do Sul, Brazil.

ABSTRACT

Acrocomia aculeata extract is known to have antioxidant and anti-inflammatory activity and also anti-diabetic and diuretic potential. In this study we aimed to evaluate the (anti) genotoxic, (anti) mutagenic, immunomodulatory and apoptotic potential of the extract in combination with cyclophosphamide. 140 male *Swiss* mice were divided into eight groups as follows: negative control, positive control (Cyclophosphamide - 100 mg / kg); groups which received solely the extract from the nut (NE) and the pulp (PE) (3, 15 and 30 mg / kg) and the combination groups (cyclophosphamide + PE or NE extract). All groups were assessed in the protocols of pre-treatment, simultaneous and post-treatment. Results indicates that both extracts are not genotoxic nor mutagenic. The extracts exerted chemopreventive activity at all tested doses and protocols, with damage reduction percentages that reached 88.19 and 90.03% for the comet assay and 69.73 and 70.93% for the micronucleus assay, for NE and PE, respectively. Regarding the immunomodulatory assays, both extracts demonstrated to cause low apoptotic events and it was found that they can reduce the ability of cyclophosphamide to cause apoptosis in cells of the liver, spleen and kidney. Facing the above, it appears that the extracts of *A. aculeata* can be considered as an functional / nutraceutical food with chemopreventive characteristics. However, the extracts are likely not to be an adjuvant for chemotherapy, especially for use in combination with the anti-tumor agent cyclophosphamide.

Keywords: chemoprevention; bioantimutagenesis; functional food; nutraceutical food; macaúba tree.

LISTA DE TABELAS

INTRODUÇÃO

Tabela 1: Principais efeitos tóxicos dos quimioterápicos em relação ao seu tempo de manifestação. INCA, 1993.....17

MANUSCRITO

Tabela 1: Grupos experimentais, dosagens e aplicação dos compostos.....41

Tabela 2: Valores Médios $\pm$ EPM dos Pesos Inicial e Final dos animais tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.....57

Tabela 3: Valores médios $\pm$ EPM da frequência de células com danos no DNA, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de (anti)genotoxicidade do ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.....58

Tabela 4: Frequência total e valores médios $\pm$ EPM referentes ao ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.....60

Tabela 5: Número total, frequência média $\pm$ EPM e porcentagem de células com evidência de fagocitose esplênica em camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.....62

Tabela 6: Valores de referência e média $\pm$ EPM relativas à contagem diferencial de células do sangue de camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.....63

Tabela 7: Avaliação de apoptose em baço, fígado e rins de camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.....65

SUMÁRIO

1. Introdução.....	13
1.1. Considerações Iniciais.....	13
1.2. Terapias Antitumorais.....	14
1.3. Quimioprevenção.....	17
1.4. Alimentos Funcionais e Nutracêuticos.....	18
1.5. <i>Acrocomia aculeata</i>	20
1.6. Ensaio Biológicos.....	22
1.6.1. Ensaio do Cometa.....	22
1.6.2. Ensaio do Micronúcleo em Sangue Periférico.....	23
1.6.3. Ensaio de Fagocitose Esplênica.....	24
1.6.4. Contagem Diferencial de Células do Sangue.....	25
1.6.5. Ensaio de Apoptose.....	25
1.7. Referências.....	26
2. Objetivos.....	35
2.1. Objetivo Geral.....	35
2.2. Objetivos Específicos.....	35
3. Manuscrito.....	36
4. Anexos.....	57
5. Considerações Finais.....	66

1. INTRODUÇÃO

1.1 Considerações Iniciais

Os genes controlam as atividades biológicas celulares e são copiados por um aparato enzimático para serem transmitidos às células filhas. Essas cópias resultantes estão sujeitas a falhas no processo que podem originar erros, as mutações. Mutação é uma alteração na estrutura do DNA que pode levar a modificação de um códon e seu produto de tradução. As mutações também podem ocorrer por ação de agentes exógenos chamados mutagênicos, que podem ser biológicos, como os vírus; químicos, como a nicotina e a ciclofosfamida; e físicos como os raios X. As mutações ocasionadas por esses agentes decorrem de alterações na molécula de DNA que se não forem corrigidas podem ocasionar prejuízos diretos as células, como problemas metabólicos, e ser transmitidas às células-filhas (PASSARGE, 2001).

As células apresentam mecanismos para reparar as mutações antes que sejam copiadas para sua descendência; esses mecanismos atuam diretamente na molécula de DNA e no ciclo celular, determinando sua continuidade ou não. Se os sistemas de reparo não conseguirem corrigir os danos, a célula é induzida a um tipo de morte programada denominada apoptose. No entanto, podem ocorrer falhas nesses sistemas e as mutações podem se acumular (ALBERTS *et al.*, 2008).

O acúmulo de mutações nos genes que controlam e regulam as funções de reparo de DNA; nos supressores tumorais, que inibem a proliferação celular; e nos proto-oncogenes, que quando se tornam oncogenes ativam a proliferação das células, pode levar ao desenvolvimento de células transformadas como as tumorigênicas, por exemplo (SNUSTAD; SIMMONS, 2008).

As células tumorais apresentam menor sensibilidade às drogas, perda da capacidade de diferenciação celular e acumulam alterações cromossômicas tais como mudanças de ploidia e alterações estruturais além de outras mutações pontuais. Essas células se dividem sem as restrições normais da divisão e podem permanecer no mesmo local (tumor benigno) ou proliferar invadindo outro tecido (tumor maligno) e/ou vasos sanguíneos ou linfáticos, sendo transportadas a outras partes do corpo (metástase) (VIEIRA *et al.*, 2012; WHO, 2015).

Xie *et al.* (2013) relataram que o câncer foi a segunda maior causa de óbitos entre indivíduos com diagnóstico de doença, ficando atrás apenas das doenças cardíacas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que até 2030 cerca de 75 milhões de pessoas terão tumores. Destes aproximadamente 27 milhões serão malignos e acarretarão 13,2 milhões de mortes pela doença em todo o mundo e estima-se que desse total, 7,5% das mortes ocorrerão no Brasil (GOSS *et al.*, 2013; SILVA; MAGALHÃES, 2013; WHO, 2015). Estima-se ainda que no Brasil, no ano de 2014, tenham ocorrido aproximadamente 576 mil novos casos de câncer e que em 2015 esse número possa se elevar para mais de 728 mil novos casos (INCA, 2014).

Segundo Corrêa *et al.* (2008), em países em desenvolvimento, a taxa de incidência do câncer pode dobrar até 2038 devido principalmente à falta de acesso da população às informações relativas ao diagnóstico, ao combate, à prevenção e à carência de recursos humanos e financeiros diretamente ligados ao tratamento e diagnóstico da neoplasia.

Apesar disso, desde os anos 2000 tem havido notável melhora no prognóstico dos doentes, sobretudo quando ocorre a descoberta precoce de tumores, e dos métodos de tratamento (quimioterapia, imunoterapia, hormonioterapia, bloqueadores enzimáticos, antineoplásicos, radioterapia e cirurgia de excisão do tumor); principalmente considerando-se a qualidade da sobrevida do paciente com o uso de medicamentos que tenham menos efeitos colaterais ou que minimizem os mesmos (BONASSA, 2005; ANDRADE; VIEIRA *et al.*, 2012).

Nesse contexto, é de fundamental importância a busca por novos compostos que atuem na prevenção e no tratamento do câncer.

1.2 Terapias Antitumorais

As primeiras cirurgias de excisão tumoral eram conservadoras e visavam somente a retirada do tumor. Gradativamente estabeleceu-se que quanto menor a margem de remoção do tecido tumoral maior era chance de recidiva local o que por vezes determina as amputações ou remoções completas de órgãos como margem de segurança. Na atualidade, e com o advento de novas terapias (radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e endocrinoterapia, principalmente), a cirurgia oncológica

voltou a ser menos radical, mas ainda constitui-se uma das principais terapias anticâncer (VIEIRA *et al.*, 2012).

A quimioterapia consiste no uso de substâncias químicas (isoladas ou combinadas) para eliminar ou reduzir neoplasias. Há evidências de utilização de sais metálicos de chumbo, cobre e arsênico no tratamento de tumores no Egito e na Grécia antigos. O primeiro quimioterápico antineoplásico da era moderna foi desenvolvido a partir do gás mostarda, arma química usada nas duas guerras mundiais. Visto que a exposição de soldados a esse composto levou à hipoplasia medular e linfóide, impedindo assim o aumento rápido do número de leucócitos, por exemplo. Esse fato permitiu supor que efeito semelhante, de redução da frequência de divisão celular, poderia ocorrer também em células tumorais, o que permitiu o tratamento dos linfomas malignos mais tarde (INCA, 2012).

Atualmente, quimioterápicos mais ativos e menos tóxicos estão disponíveis para uso na prática clínica. Entretanto, essas drogas afetam indistintamente as células neoplásicas e as normais, apesar de acarretarem maiores danos genéticos às células malignas devido às diferenças metabólicas dessas duas populações celulares (INCA, 2012).

A maioria dos quimioterápicos interfere nos mecanismos de controle do ciclo celular, com base nesse fato, Bruce e seu grupo de pesquisa, no ano de 1969, classificaram-nos de acordo com sua ação no ciclo em: (I) ciclo-inespecíficos, aqueles que atuam em células que estão ou não no ciclo proliferativo; (II) ciclo-específicos, que atuam somente nas células em divisão e (III) fase-específicos, que agem em certas fases do ciclo celular (INCA, 1993).

Ainda de acordo com Laurence *et al.* (2012), os quimioterápicos podem ser classificados por seu mecanismo de ação como: (1) Agente Alquilantes, que formam ligações covalentes com o DNA de modo a impedir sua replicação; (2) Agentes Antimetabólitos, os quais bloqueiam ou modificam as vias metabólicas responsáveis pela síntese de DNA; (3) Inibidores Mitóticos, que impedem a polimerização e a despolimerização das tubulinas que formariam o fuso mitótico impedindo a migração das cromátides ou cromossomos paralisando a divisão; (4) Hormônios e seus Antagonistas, os quais inibem a secreção ou a ação de um hormônio; e (5) outros agentes, que possuem mecanismos de ação no tratamento de tumores diferenciados dos descritos.

Para aumentar o sucesso dos tratamentos, é comum na prática clínica a combinação de quimioterápicos que possuam modos de ação e toxicidade diferentes para que se atinja populações celulares distintas. Dessa forma, as linhagens celulares resistentes a um fármaco podem ser potencialmente eliminadas por outro, promovendo melhor resposta (INCA, 2012; VIEIRA *et al.*, 2012).

Como os quimioterápicos não atuam exclusivamente sobre as células tumorais, estruturas/órgãos que fazem renovação celular constante (medula óssea, pelos, mucosa do trato digestório e epitélios) são atingidas, de forma severa, pela ação desses medicamentos. Entretanto, as células normais têm um tempo de recuperação conhecido, ao contrário das anaplásicas, o que torna possível a aplicação da quimioterapia em intervalos regulares, desde que observados os tempos necessários para recuperação dos tecidos normais (INCA, 2012).

Como os quimioterápicos erradicam tanto células tumorais quanto normais, são esperados efeitos colaterais devido à citotoxicidade dos mesmos e de acordo com a dose administrada, o tempo de exposição e a concentração plasmática do medicamento. A toxicidade ainda depende do medicamento utilizado e é variável para os diversos tipos de tecidos como pode ser observado na Tabela 1. Nessa estão apresentados os principais efeitos tóxicos dos quimioterápicos em relação ao seu tempo de manifestação no organismo.

É possível considerar ainda que células tumorais podem sofrer novas mutações, inclusive por efeito da quimioterapia, que as tornem capazes de sobreviver à ação do medicamento em uso. Ou mesmo que essas células já existam no tumor e sejam selecionadas positivamente, por ação do quimioterápico, que passa a ser ineficiente no tratamento (CHEUNG *et al.*, 2010).

Devido ao exposto acima e a toxicidade das drogas quimioterápicas, a busca por novos fármacos que apresentem maior capacidade de erradicar células tumorais preservando as normais faz-se cada vez mais necessária e tem se mostrado uma atividade constante em muitos grupos de pesquisa.

Tabela 1: Principais efeitos tóxicos dos quimioterápicos em relação ao seu tempo de manifestação. INCA, 1993.

Precoces (de 0 a 3 dias)	Imediatos (de 7 a 21 dias)	Tardios (meses)	Ultra-tardios (meses ou anos)
<ul style="list-style-type: none"> • Náuseas • Vômito • Mal estar • Adinamia • Agitação • Artralgias • Exantemas • Flebites 	<ul style="list-style-type: none"> • Mielossupressão • Granulocitopenia • Plaquetopenia • Anemia • Mucosites • Cistite hemorrágica (ciclofosfamida) • Imunossupressão • Potencialização dos efeitos das radiações (actinomicina D, adriamicina e 5-fluoruracil) 	<ul style="list-style-type: none"> • Miocardiopatia (antracíclicos) • Hiperpigmentação e esclerodermia (bleomicina) • Alopecia • Pneumonite (bleomicina) • Imunossupressão • Neurotoxicidade (vincristina, vimblastina e cisplatina) • Nefrotoxicidade (cisplatina) 	<ul style="list-style-type: none"> • Infertilidade • Carcinogênese • Mutagênese • Distúrbio do crescimento em crianças • Sequelas no sistema nervoso central • Fibrose/cirrose hepática (metotrexato)

1.3 Quimioprevenção

O termo cunhado por Sporn, em 1976, compreende o uso de substâncias naturais ou sintéticas que possam interromper, modular ou reverter a formação e a transformação de lesões pré-malignas em carcinomas invasores (VIEIRA *et al.*, 2012).

Vários estudos tem demonstrado que o consumo de alimentos funcionais pode interferir na carcinogênese e reduzir a mortalidade por câncer devido à presença de compostos bioativos tais como o resveratrol, o licopeno, os ácidos graxos ômega-3, 6 e 9, os carotenoides, os tocoferóis e o ácido ascórbico (GRACIANI *et al.*, 2007; MADADI *et al.*, 2015) dentre outros.

A quimioprevenção pode ser mediada por antimutagênese, que, segundo Kada *et al.* (1982) ocorre por dois processos: a desmutagênese e a bioantimutagênese. O

primeiro se caracteriza pelo impedimento da ação mutagênica e genotóxica de um composto ou substância. Este processo, geralmente, ocorre no meio extracelular por adsorção do mutágeno pelo composto antimutagênico. Essa ação pode ser química e direta contra o agente mutagênico, enzimática (depois do mutágeno ser metabolizado) ou pelo sequestro de radicais livres derivados do mutágeno de modo a impedir sua ligação com o DNA (KADA; SHIMOI, 1987; DE FLORA; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

A bioantimutagênese está relacionado à capacidade já existente na célula de corrigir danos ao DNA. Logo, esses compostos bioantimutagênicos atuam na modulação dos sistemas de reparo e duplicação do DNA em nível celular, inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erros ou estimulando os reparos livres de erros (HARTMAN; SHANKEL, 1990; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Segundo Murthy *et al.* (2009) há uma estreita relação entre o risco de carcinogênese, o estado nutricional e a dieta do indivíduo, e essa relação é alvo de várias pesquisas em saúde pública. A dieta ainda representa um importante fator na etiologia do câncer e, portanto, sua mudança pode levar a redução na incidência da doença, abrindo caminho para a utilização de alimentos funcionais e nutracêuticos com conhecidas propriedades antimutagênicas.

Assim, por meio do consumo de antimutagênicos e anticarcinogênicos, preferencialmente os de origem naturais, alimentos quimiopreventivos podem ser incorporado à dieta humana, mudando os hábitos alimentares, e assim a quimioprevenção tornar-se-ia efetiva na prevenção do câncer e de outras doenças de origem genética (GOMES *et al.*, 1996; MALUF; ERDTMANN, 2003; PAN; HO, 2008).

1.4 Alimentos Funcionais e Nutracêuticos

O conceito de alimento funcional foi desenvolvido inicialmente na década de 1980 no Japão, com base em estudos que relacionavam satisfação sensorial, nutrição e modulação de sistemas fisiológicos (SIRÓ *et al.*, 2008), por meio de um programa governamental que desejava desenvolver alimentos saudáveis para uma população cada vez mais velha e com elevada expectativa de vida (ANJO, 2004).

Alimentos funcionais são aqueles que, consumidos cotidianamente, podem acarretar benefícios fisiológicos, devido à presença de ingredientes fisiologicamente saudáveis (CÂNDIDO; CAMPOS, 2005); isto é, apresentam, além das propriedades nutricionais, capacidade de regular ou auxiliar a regulação de funções corporais promovendo proteção contra doenças como as coronarianas, hipertensão, osteoporose, diabetes e câncer (SOUZA *et al.*, 2003) dentre outras.

Já o nutracêutico é um alimento ou parte deste que acarreta benefícios médicos e de saúde tais como tratamento e/ou prevenção de doenças (ROBERFROID, 2002). Segundo Pennington (2002), diversos alimentos de fontes vegetais possuem fitoquímicos com ação fisiológica ou metabólica específicas, podendo ser considerados bioativos como os carotenoides, compostos fenólicos e flavonoides, geralmente de ação antioxidante.

Nessa linha de pensamento insere-se a pesquisa por novos compostos que possam prevenir, tratar ou auxiliar no tratamento das neoplasias. Kuete *et al.* (2011), a partir da sabedoria popular dos povos de Camarões, relataram a atividade anticancerígena de compostos naturais extraídos de plantas medicinais. Ait-Mohamed *et al.* (2011), demonstraram que o extrato de *Buxus sempervirens*, planta típica da região mediterrânea, induz paradas no ciclo celular, apoptose e autofagia em células de câncer mamário. Lee *et al.* (2005) relataram o efeito quimiopreventivo da capsaicina extraída da *Capsicum chinense*, pimenta de cheiro. Além da capsaicina outros compostos naturais também apresentam efeito quimiopreventivo e dentre eles destacam-se o licopeno, presente no tomate, a alicina do alho e a genisteína da soja (DORAI; AGGARWAL, 2004) dentre outros.

O Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) e o projeto Lista de Espécies da Flora do Brasil (LEFB) do programa REFLORA do Instituto Jardim Botânico do Rio de Janeiro, estima que o Brasil conte com cerca de 45 a 60 mil espécies de vegetais, muitos dos quais apresentam propriedades medicinais segundo a sabedoria popular e têm sido pesquisadas para extração de compostos bioativos e avaliação de suas propriedades clínicas e medicinais (VELOSO *et al.*, 1991; BRASIL, s.d.; LEFB, 2010).

Veloso *et al.* (1991) e Pezzuto (1997), acrescentam que a flora brasileira é uma grande fonte de produtos naturais que podem e vem sendo descritos e utilizados no tratamento e na prevenção de diversas doenças, inclusive o câncer. Com base nesses

dados e na indicação da medicina popular sobre o macaubeiro e seus frutos, o presente trabalho se propôs a investigar o seu potencial (anti)genotóxico, (anti)mutagênico, imunomodulatório e apoptótico.

1.5 *Acrocomia aculeata*

Acrocomia aculeata (Jacq.) Lodd. ex Mart., popularmente denominada por bacaiúva, bocaiúva, coco-de-catarro, coco-de-espinho, imbocaiá, macaíba, macaiúva, macaúba, macujá, mocujá e umbocaiúva, de acordo com a região brasileira em que se encontra (LORENZI, 1992), pertence à família Arecaceae e distribui-se por todo o território nacional. Mas, principalmente dos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo e Rio de Janeiro até o Pará, sobretudo em regiões de vegetação esparsa e aberta, como cerrado e matas semidecíduas (LORENZI, 2006; RODRIGUES, 2007).

O nome do macaubeiro, *Acrocomia aculeata*, relaciona-se às características dessas plantas: a folhagem densa (copa plumosa) e com espinhos. Além de estipe simples, cilíndrico, variando entre 10 e 15 metros de altura e 0,2 a 0,3 metros de diâmetro, recoberto em seu cume pelas bainhas das folhas pinadas, que variam entre 10 e 30 por planta, com espinhos associados que se distribuem irregularmente. O macaubeiro possui também inflorescências interfoliárias com flores amarelas pistiladas de inserção axial (LORENZI, 2006).

Essa planta destaca-se também por apresenta frutos entre 3,5 e 5 cm de diâmetro, parcialmente achatados, globulares ou esféricos com epicarpo verde-amarelado de aspecto lenhoso, mesocarpo fibro-mucilaginoso de cor que varia do branco pálido ao amarelo a medida que os mesmos vão maturando. O epicarpo possui ainda aroma e sabor palatáveis e adocicados. O endocarpo apresenta parede óssea de cor escura firmemente aderida ao mesocarpo (polpa). A amêndoa, geralmente presente uma por fruto, apresenta uma fina camada de tegumento, sendo oleaginosa e também comestível (LORENZI, 2006). As primeiras frutificações ocorrem entre o quarto e o sexto ano após o plantio gerando uma média de 400 frutos por cacho,. Em geral, cada palmeira produz entre dois e oito cachos o que permite inferir uma produção anual em torno de 70 a 80 Kg de fruto. A frutificação dessa planta ocorre ao longo de todo o ano, mas a maturação dos frutos se concentra entre setembro e janeiro (ALMEIDA, 1998).

Há alguns anos essa espécie tem se destacado econômica e ecologicamente. Segundo a medicina popular, a ingestão da polpa em jejum é recomendada para efeito purgativo. Já o óleo é usado para combater cefaleias e nevralgias. A emulsão da polpa e da amêndoa é usada no tratamento de afecções respiratórias. Já o óleo da amêndoa é usado cosmeticamente como reidratante e retardador de envelhecimento cutâneo (LIMA *et al.*, 2003).

Diversos extratos vegetais são usados em pesquisas sobre tratamento e prevenção do câncer, como por exemplo: *Plectranthus barbatus* (boldo-de-jardim ou boldo-da-terra) (COSTA; NASCIMENTO, 2003), *Lippia alba* (erva-cidreira-de-arbusto) (COSTA *et al.*, 2004), *Olea europaea* (oliveira) (EVANGELISTA *et al.*, 2004), *Brassica napus* (couve-nabiça) (EVANGELISTA *et al.*, 2004), *Viola sebifera* (ucuúba vermelha) (DENNY *et al.*, 2007), *Pothomorphe umbellata* (pariparoba) (ALMEIDA *et al.*, 2008) e *Cymbopogon citratus* (capim-limão) (VILLAVERDE *et al.*, 2013), dentre outros. No entanto, não foi encontrada, na literatura pesquisada, análise das propriedades quimiopreventivas dos extratos da polpa e da amêndoa da macaúba.

Em relação às análises sobre a composição dos extratos da polpa e da amêndoa, Hiane *et al.* (2006) e Ramos *et al.* (2008), relatam que as amêndoas apresentam alto teor de lipídios (51,7%), de proteínas (17,6%) e de fibras (15,8%); enquanto que na polpa há prevalência de carboidratos totais (31%), sendo os principais constituintes o amido (12 a 13%) e a glicose (7 a 12%), e os lipídios (17%).

Em estudos anteriores, Hiane *et al.* (2005) relataram a presença de cerca de 66%-73% de ácido oleico (um monoinsaturado) e 16% de ácido palmítico (um ácido saturado) na polpa pura do fruto e de aproximadamente 40% e 12% dos mesmos ácidos, respectivamente, na amêndoa de macaúba. Foram descritos também traços de ácido linolênico (2,5% em polpa e 1,9% em amêndoa) e araquídico (0,5% em polpa e 0,3% em amêndoa). O mesmo estudo demonstrou ainda uma grande quantidade total de ácidos graxos monoinsaturados (66,88% na polpa e 42,46% na amêndoa) e poli-insaturados (7,62% na polpa e 7,83% na amêndoa) (ESTEFAN *et al.*, 2010; AMARAL *et al.*, 2011).

Ramos *et al.* (2008) caracterizam a presença de carotenoides na polpa de macaúba, dos quais, cerca de 80% correspondem ao β -caroteno (49,0 $\mu\text{g/g}$ de polpa úmida) e Coimbra e Jorge (2011) quantificaram a presença de tocoferóis, também na polpa, e demonstraram que 67,48% dos mesmos são α -tocoferol (143,70 mg/kg).

Ao estudar as funções biológicas de constituintes de extratos, Longo *et al.* (2001), evidenciaram que o ácido oleico, um tipo de ômega 9 (AGn-9), inibe a agregação plaquetária, aumenta o colesterol do tipo Lipoproteína de Alta Densidade (HDL) e diminui o colesterol total do organismo, atuando como protetor contra o desenvolvimento de doenças coronárias ateroscleróticas, além de possuir ação antioxidante e assim reduzir o estresse oxidativo e a peroxidação lipídica nas membranas (NAGARAJU; LOKESHI, 2007). Maio *et al.* (2010) observaram ainda efeito antiproliferativo do β -caroteno em carcinogênese induzida em animais e em cultura celular de diversos tipos.

1.6 Ensaios Biológicos

1.6.1 Ensaio do Cometa

O ensaio do cometa é uma técnica relativamente simples, rápida, sensível e eficientemente empregada na avaliação e na quantificação de danos genéticos promovidos por agentes físicos e químicos, principalmente. É utilizado em pesquisas de genotoxicidade e para monitoramento ambiental. Apresenta baixo custo, requer pouco tempo e material celular sendo aplicada a qualquer tipo de célula eucariótica individualizada ou de tecido do qual se obtenha suspensão celular (OLIVE *et al.*, 1992; FAIRBAIRN *et al.*, 1995; ROSS *et al.*, 1995; TICE, 1995; KLAUDE *et al.*, 1996; ANDERSON *et al.*, 1998; TICE *et al.*, 2000; FRIEAUFF *et al.*, 2001). O teste é realizado em lâminas que podem ser analisadas em microscopia convencional ou de fluorescência onde evidencia-se imagens de nucleóides intactos (sem danos no DNA) e com fragmentos que formam caudas que se assemelham a cometas (com danos no DNA), (TICE, 1995).

Em 1978, Rydenberg e Johanson foram os primeiros pesquisadores a utilizar a quantificação direta do DNA em células individuais. Em 1984 Östling e Johanson incluíram no teste a eletroforese em pH 9,5, que aumentou sua sensibilidade (TICE, 1995). Mais tarde, Singh *et al.* (1988) passaram a realizar a eletroforese em pH > 13 (alcalino), tornando o teste de grande importância para detecção *in vivo* e *in vitro* de

quebras de fita única e dupla, sítios alcalilábeis, crosslinks e sítios de reparação por excisão.

O ensaio atualmente é feito depositando células em uma lâmina de vidro para microscopia recoberta com agarose e em seguida a lise para desnaturação do DNA e eletroforese em $\text{pH} > 13$, seguida de neutralização, fixação e coloração com um agente intercalante (como o brometo de etídio) para análise em microscopia de fluorescência na qual serão verificados e classificados os cometas, evidências da fragmentação do DNA (OLIVE *et al.*, 1992; SPEIT e HARTMANN, 1999). Os cometas são classificados por análise visual em: classe 0 – nucleóides não danificados e sem cauda; classe 1 – nucleóides com cauda menor que o seu diâmetro; classe 2 – nucleóides com cauda de tamanho ente 1 a 2 vezes o seu diâmetro; classe 3 – nucleóides com cauda 2 vezes maior que o seu diâmetro; nucleóides totalmente fragmentados (células apoptóticas) não são contabilizados (KOBAYASHI, 1995; SPEIT *et al.*, 1996).

1.6.2 Ensaio do Micronúcleo em sangue periférico

As mutações cromossômicas são um evento importante da carcinogênese e esses danos são biomarcadores indiretos do desenvolvimento dessa doença. Desse modo, estudos ao nível cromossômico são essenciais. Um dos métodos mais utilizados para avaliar e quantificar os danos cromossômicos, devidos à exposição a agentes químicos ou físicos, é o teste do micronúcleo. Esse teste que permite avaliar a capacidade cancerígena de um composto foi preconizado em linfócitos periféricos humanos e, mais tarde, foi padronizado em eritrócitos em modelos experimentais *in vivo* (TUCKER; PRESTON, 1996; KRISHNA; HAYASHI, 2000).

Schmid (1975) sugeriu a avaliação de micronúcleos em hemácias jovens uma vez que ao expelir o núcleo para se tornar eritrócito, os micronúcleos permanecem no citoplasma dessas células, podendo ser identificados com facilidade quando corados com Giemsa. Em 1990, Hayashi *et al.* descreveram a técnica com o uso do corante Alaranjado de Acridina que, intercalado com DNA, emite fluorescência amarela sob radiação ultravioleta; e quando o mesmo se liga ao RNA, entretanto, sem intercalar à molécula, a fluorescência emitida é vermelha. Essas diferenças permitem identificar os eritrócitos jovens (reticulócitos), que são ricos em RNA citoplasmático, e contabilizar

facilmente os micronúcleos (que aparecem em amarelo devido à presença de DNA) (HAYASHI *et al.*, 1990).

Kishi *et al.* (1992) demonstraram boa correlação nos resultados obtidos entre a coloração por Giemsa, para medula óssea, e a pré-coloração com Alaranjado de Acridina, para sangue periférico. Isso indica que ambas as técnicas podem ser adequadamente usadas para a avaliação de danos mutagênicos. No entanto, a técnica que utiliza sangue periférico apresenta a vantagem da possibilidade de várias coletas de sangue de um mesmo espécime sem necessidade de eutanásia. Logo, permite avaliar a frequência de micronúcleos num mesmo animal ao longo do tratamento e a recuperação do mesmo após o final do mesmo (CSGMT, 1992; OLIVEIRA *et al.*, 2009).

1.6.3 Ensaio de Fagocitose Esplênica

O baço é dividido em compartimentos por trabéculas de tecido conjuntivo provenientes de sua cápsula. O parênquima medular apresenta três áreas: (I) polpa vermelha - formada por seios esplênicos entre os quais estão os cordões esplênicos que constituem os plexos sanguíneos e com predomínio de macrófagos, hemácias e plaquetas; (II) polpa branca - constituída por nódulos linfáticos e as bainhas periarteriolas onde se encontram principalmente linfócitos; e (III) zona marginal - localizada na periferia da polpa branca contendo as artérias marginais (GROOM *et al.*, 1991).

O baço é o maior acúmulo de tecido linfático do corpo e remove restos celulares, células lesionadas, xenobióticos, dentro outros, do sangue por fagocitose. Também é um dos principais órgãos do sistema imunológico, pois suas células capturam e apresentam antígenos aos linfócitos T e B estimulando a produção de plasmócitos secretores de anticorpos. Ainda apresenta função hematopoiética, sobretudo em caso de anemia, e pode sequestrar elementos do sangue tais como as plaquetas e os leucócitos (MEBIUS; KRAAL, 2005).

Como está diretamente envolvido nos processos de imunomodulação, é essencial avaliar as taxas de fagocitose ocorridas nesse órgão para verificar a capacidade de estímulo ou inibição que os compostos em testes apresentam sobre o sistema imunológico (HAYASHI *et al.*, 1990).

1.6.4 Contagem Diferencial de Células do Sangue

A contagem das diferentes células sanguíneas é importante para avaliação imunológica (EVANS, 1997), pois permite, por meio da comparação com valores de referência e juntamente com os dados de fagocitose esplênica, avaliar as propriedades imunomodulatórias dos compostos em teste.

A produção dessas células (hematopoese) é um conjunto de processos complexos no qual duas linhagens celulares são produzidas pelas células tronco hematopoiéticas: (I) mieloide e (II) linfoide (MORRISON *et al.*, 1995; AKASHI *et al.*, 2000). A linhagem linfoide origina os linfócitos T, B e células *Natural Killer* (NK) e a linhagem mieloide dá origem aos monócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, eritrócitos e plaquetas (ABKOWITZ *et al.*, 2000; AKASHI, 2005).

Os leucócitos possuem funções específicas na defesa do organismo já que (I) neutrófilos fagocitam bactérias e fungos e participam de reação de inflamação aguda (VELDERS; FIBBE, 2005); (II) eosinófilos mediam processos inflamatórios ligados à alergia, defesa contra vermes e distúrbios cutâneos e neoplásicos (SANDERSON, 1992); (III) basófilos efetuam reações de hipersensibilidade imediata (GALLI, 1993); (IV) monócitos, presentes nos tecidos, fagocitam células senescentes ou mortas e corpos estranhos (SUZUKI *et al.*, 2004); (V) linfócitos B, quando ativados diferenciam-se em células secretoras de anticorpos; (VI) linfócitos T (fisiologicamente diferentes), divididos em células T auxiliares e os linfócitos T citotóxicos, destroem células infectadas; e (VII) as células *Natural Killer* reconhecem e destroem células anormais, como as infectadas por vírus e as tumorais (JANEWAY *et al.*, 2002; ABBAS; LICHTMAN, 2005).

De modo geral, os leucócitos atuam na imunidade e nos processos inflamatórios e como os parâmetros hematológicos podem ser utilizados como biomarcadores, variações dos mesmos podem indicar lesões em outros tecidos ou órgãos por infecções, infestações ou mudanças ambientais (SHAHSAVANI *et al.*, 2010).

1.6.5 Ensaio de Apoptose

A verificação das taxas de apoptose em órgãos pelos quais os compostos em teste e/ou seus metabólitos transitam permite inferir a citotoxicidade dos mesmos.

Em 1885 Flemming descreveu morfológicamente o processo hoje chamado de apoptose (morte celular programada), termo cunhado por Kerr (1972) para descrever a morfologia e a sequência de eventos característicos que diferem esse processo da necrose (RAFF, 1992). A apoptose caracteriza-se pela clivagem da cromatina seguida de colapso nuclear, condensação do citoplasma e mudanças na membrana plasmática sem instauração de processo inflamatório (RAFF, 1992).

Apoptose pode ser identificada e quantificada, citologicamente, pela análise do padrão de fragmentação do DNA nuclear usando a técnica de Rovozzo (1973) modificada e readaptada para experimentos *in vivo*, por Navarro *et al.*, (2014) usando coloração com Alaranjado de Acridina.

1.7 Referências

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.. Imunologia celular e molecular. 5ª. Ed. Rio de Janeiro. Elsevier, 2005.

ABKOWITZ, J.L.; GOLINELLI, D.; HARRISON, D.E.; GUTTORP, P.. *In vivo* kinetics of murine hemopoietic stem cells. *Blood*, v.96, p.3399-3405, 2000.

AIT-MOHAMED, O.; BATTISTI, V.; JOLIOT, V.; FRITSCH, L.; MEDJKANE, S.; REEUILH, C.; LAMOURIM A.; FAHY, C.; RHOLAM, M.; ATMANI, D.; AIT-SIALI, S.. Acetonic extract of *Buxus sempervirens* induces cell cycle arrest, apoptosis and autophagy in breast cancer cells. *PLoS One*, v.6, p.e24537, 2011.

AKASHI, K.. Lineage promiscuity and plasticity in hematopoietic development. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1044, p.125-131, 2005.

AKASHI, K.; TRAVER, D.; MIYAMOTO, T.; WEISSMAN, I.L.. A clonogenic common myeloid progenitor that give rise to all myeloid lineages. *Nature*, v.404, p.193-197, 2000.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A. LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P.. *Biologia Molecular da Célula*. 4ª Ed. Porto Alegre: ArtMed, 2008.

ALMEIDA, R.L.; SILVA, V.V.; RIVELLI, D.P.; MIRANDA, D.V.; SAWADA, T.C.H.; BARROS, S.B. M.; REPKE, C.D.. Padronização e determinação da fotoestabilidade do extrato de folhas de *Pothomorphe umbellata* L. Miq (pariparoba) e avaliação da inibição *in vitro* de metaloproteínases 2 e 9 na pele. *Rev. Bras. Cien, Farm.* v.44, p.43-50, 2008.

ALMEIDA, S.P.. *Espécies vegetais úteis*. 1.Ed. Planaltina, Brasília-DF: EMBRAPA-CEPAC, 1998.

AMARAL, F.P.; BROETTO, F.; BATISTELLA, C.B.; JORGE, S.M.A.. Extração e caracterização qualitativa do óleo da polpa e amêndoas de frutos de Macaúba [*Acrocomia aculeata* (Jacq) Lodd. ex Mart] coletada na região de Botucatu – SP. Revista Energia na Agricultura, v.26, p.12-20, 2011.

ANDERSON, D.; YU, T.W.; MC-GREGOR, D.B.. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. Mutagenesis, v.13, p.539-555, 1998.

ANDRADE, M.; SILVA, S.R.. Administração de quimioterápicos: uma proposta de protocolo de enfermagem. Rev. Bras. Enferm., v.60, p.331-335, 2007.

ANJO, D.L.C.. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. J. Vasc. Br., v.3, p.145-154, 2004.

BONASSA, E.M.A.. Enfermagem em terapêutica oncológica. 3Ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

BRASIL. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). Flora Brasileira: Espécies de Plantas. Estimativas. s.d.. Disponível em: <<http://cod.ibge.gov.br/20vvg>>. Acesso em: 20 mar.2014.

CÂNDIDO, L.M.B.; CAMPOS, A.M.. Alimentos funcionais. Uma revisão. Boletim da SBCTA. v.29, p. 193-203, 2005.

CHEUNG, C.H.A.; WU, S.Y.; LEE, T.R.; CHANG, C.Y.; WU, J.S.; HSIEH, H.P.; CHANG, J.Y.. Cancer cells acquire mitotic drug resistance properties through beta-tubulin mutations and alterations in the expression of beta-tubulin isotypes. PLoS One, v.5, p.e12564, 2010.

COIMBRA, M.C.; JORGE, N.. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. Food Res. Int., v.44, p.2139–2142, 2011.

CORRÊA, G. de C.; NAVES, R.V.; ROCHA, M.R.; CHAVES, L.J.; BORGES, J.D.. Determinações físicas em frutos e sementes de baru (*Dipteryx alata* vog.), cajuzinho (*Anacardium othonianum* rizz.) e pequi (*Caryocar brasiliense* camb.), visando melhoramento genético. Biosci. J., v.24, p.42-47, 2008.

COSTA, M.C.D.; NASCIMENTO, S.C.. Atividade citotóxica de *Plectranthus barbatus* Andr. (Lamiaceae). Acta Farm. Bonaerense, v.22, p.155-158, 2003.

COSTA, M.C.D.; AGUIAR, J.S.; NASCIMENTO, S.C.. Atividade citotóxica de extratos brutos de *Lippia alba* (Mill.) N.E. Brown (Verbenaceae). Acta Farm. Bonaerense, v.23, p.349-352, 2004.

CSGMT. Collaborative Study Group for the Micronucleus Test. Micronucleus test with mouse peripheral blood erythrocytes by acridine orange supravital staining: the summary report of the 5th collaborative study by CSGMT/JEMS.MMS. Mutat. Res., v.278, p.83-98, 1992.

DE FLORA, S.; FERGUSON, L.R.. Overview of mechanisms of cancer chemopreventive agents. *Mutat. Res.*; 591: 8–15, 2005.

DENNY, C.; ZACHARIAS, M.E.; KOHN, L.K.; FOGGIO, M.A.; CARVALHO, J.E.. Atividade antiproliferativa dos extratos e da fração orgânica obtidos das folhas de *Virola sebifera* Aubl. (Myristicaceae). *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.17, p.598-603, 2007.

DORAI, T.; AGGARWAL, B.B.. The antimicrobial properties of chie peppers (*Capsicum* species) and their uses in Mayan medicine. *Cancer Letters*. v.17, p.1263-1265, 2004.

ESTEFAN, A.O.; Silva, M.A.; Arena, A.C.; Argandona, E.J.S.; Breda, C.A.; Kassuya, C.A.L.. Estudo do potencial antiinflamatório dos extratos de *Acrocomia aculeata* no processo inflamatório agudo e crônico em modelos experimentais. In: III Simpósio Intercâmbio Brasil-Japão em Sustentabilidade: um desafio da humanidade. 2010. Disponível em: <<http://japao.org.br/simposio2010/wp-content/uploads/2010/PA020.pdf>>. Acesso em: 21 mar. 2015.

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

EVANS, T. Developmental biology of hematopoiesis. *Hemat. Oncol. Clin. North. Am.*, v.11, p.1115-1147, 1997.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. *Mutat. Res.*, v.339, p.37-59, 1995.

FRIEAUFF, W.; HARTMANN, A.; SUTER, W.. Automatic analysis of slides processed in the Comet assay. *Mutagenesis*, v.16, p.133-137, 2001.

GALLI, S.J.. New concepts about the mast cells. *N. Engl. J. Med.*, v.328, p.257-265, 1993.

GOMES, E.M.; SOUTOT, P.R.F.; FELZENSZWALB, I. Shark-cartilage containing preparation protects cells against hydrogen peroxide induced damage and mutagenesis. *Mutat. Res.* v. 367, p. 203-208, 1996.

GOSS, P.E.; LEE, B.L.; BADOVINAC-CRNJEVIC, T.; STRASSER-WEIPPL, K.; CHAVARRI-GUERRA, Y.; ST LOUIS, J.; VILLARREAL-GARZA, C.; UNGER-SALDAÑA, K.; FERREYRA, M.; DEBIASI, M.; LIEDKE, P.E.; TOUYA, D.; WERUTSKY, G.; HIGGINS, M.; FAN, L.; VASCONCELOS, C.; CAZAP, E.; VALLEJOS, C.; MOHAR, A.; KNAUL, F.; ARREOLA, H.; BATURA, R.; LUCIANI, S.; SULLIVAN, R.; FINKELSTEIN, D.; SIMON, S.; BARRIOS, C.; KIGHTLINGER, R.; GELRUD, A.; BYCHKOVSKY, V.; LOPES, G.; STEFANI, S.; BLAYA, M.; SOUZA, F.H.; SANTOS, F.S.; KAEMMERER, A.; DE AZAMBUJA, E.; ZORILLA, A.F.; MURILLO, R.; JERONIMO, J.; TSU, V.; CARVALHO, A.; GIL, C.F.; STERNBERG, C.; DUEÑAS-GONZALEZ, A.; SGROI, D.; CUELLO, M.; FRESCO, R.; REIS, R.M.; MASERA, G.; GABÚS, R.; RIBEIRO, R.; KNUST, R.; ISMAEL, G.; ROSENBLATT, E.; ROTH, B.; VILLA, L.; SOLARES, A.L.; LEON, M.X.; TORRES-

VIGIL, I.; COVARRUBIAS-GOMEZ, A.; HERNÁNDEZ, A.; BERTOLINO, M.; SCHWARTSMANN, G.; SANTILLANA, S.; ESTEVA, F.; FEIN, L.; MANO, M.; GOMEZ, H.; HURLBERT, M.; DURSTINE, A.; AZENHA, G... Planning cancer control in Latin America and the Caribbean. *Lancet Oncol.*, v.14, p.391-436, 2013.

GRACIANI, A.R.; LÓPEZ, C.E.; SUAREZ, S.V.; CABRERA, A.D.. Utilidad del ácido acetil salicílico en la prevención del cáncer de colon: revisión. *Rev. Posgrado Via. Cátedra Med.*, v.176, p.13-16, 2007.

GROOM, A.C.; SCHMIDT, E.E.; MacDONALD, I.C. Microcirculatory pathways and blood flow in spleen: new insights from washout kinetics, corrosion casts, and quantitative intravital videomicroscopy. *Scan. Microsc.*, v.5, p.159-174, 1991.

HARTMAN, P. E.; SHANKEL, D. M. Antimutagens and anticarcinogens: a survey of putative interceptor molecules. *Environ. Mol. Mutagen.*, v.15, p.145-182, 1990.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE-JUNIOR, M. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, v.245, p.245-249, 1990.

HIANE, P.A.; FILHO, M.M.R.; RAMOS, M.I.L.; MACEDO, M.L.R.. Bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd., pulp and kernel oils: characterization and fatty acid composition. *Braz. J. Food Technol.*, v.8, p.256-259, 2005.

HIANE, P.A.; BALDASSO, P.A.; MARANGONI, S.; MACEDO, M.L.R.. Chemical and nutritional evaluation of kernels of bocaiuva, *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.26, p.683-689, 2006.

INCA. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativa. 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>. Acesso em: 13 out. 2014.

_____. Pró-Onco. Controle do Câncer: uma proposta de integração ensino-serviço. 1993. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=101>. Acesso em: 13 out. 2014.

_____. Tratamento [Internet]. 2012. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 13 out. 2014.

JANEWAY, C.A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; SHLOMCHIK, M. *Imunobiologia: O sistema imune na saúde e na doença*. 5Ed., Porto Alegre: Artmed, 2002.

KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N.. Environmental desmutagens and antimutagens. In: E. J. Klekowsky (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger: New York, p.137-151, 1982.

KADA, T.; SHIMOI, K.. Desmutagens and bio-antimutagens - their modes of action. *Bioessays*, v.7, p.113-116, 1987.

KERR, J.F.R.; WYLLIE, A.H.; CURRIE, A.R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br. J. Cancer*, v.26, p.239-257, 1972.

KISHI, M.; HORIGUCHI, Y.; WATANABE, S.; HAYASHI, M.. Validation of the mouse peripheral blood micronucleus assay using acridine orange supravital staining with urethane. *Mutat. Res.*, v.278, p.205-208, 1992.

KLAUDE, M.; ERIKSSON, S.; NYGREN, J.; AHNSTRÖM, G.. The comet assay: mechanisms and technical considerations. *Mutat. Res.*, v.363, p.89-96, 1996.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.*, v.2, p.103-115, 1995.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay: protocol, conduct and data interpretation. *Mutat. Res.*, v.455, p.155-166, 2000.

KUETE, V.; WABO, H.K.; EYONG, K.O.; FEUSSI, M.T.; WIENCH, B.; KRUSCHE, B.; TANE, P.; FOLEFOG, G.N.; EFFERTH, T.. Anticancer activities of six selected natural compounds of some cameroonian medicinal plants. *PLoS One*. v.6; p.e21762, 2011.

LAURENCE, L.; BRUNTON, D.; BJÖRN, C.K.; BRUCE, A.C.. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica DE Goodman & Gilman*. 12Ed. Rio de Janeiro: ARTMED; 2012.

LEE, J.J.; CROSBY, K.M.; PIKE, L.M.; YOO, K.S.; LESKOVAR, D.I. Impact of genetic and environmental variation on development of flavonoids and carotenoids in pepper (*Capsicum* spp.). *Sci. Hortic.*, v.106, p.341-352, 2005.

LIMA, E.S.; FELFILI, J.M.; MARIMON, B.S.; SCARIOT, A.. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado sensu stricto no Brasil Central – DF. *Rev. Brasil. Bot.*, v.26, p.361-370, 2003.

LEFB. Lista de Espécies da Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro. 2010. Disponível em: <<http://floradobrasil.jbrj.gov.br/>>. Acesso em: 04 fev 2015.

LONGO, S.; NAKASATO, M.; COSTA, R.P.; LOTTENBERG, A.M.; FISBERG, M.; QUINTÃO, E.. Alimentação e ácidos graxos n-3, n-6. In: DIAMENT, J.; BERTOLAMI, M.; GRINBERG, M.; TIMERMAN, A.. Ácidos graxos n-3, n-6 e prevenção de doenças vasculares. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.77, p.287-310, 2001.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LORENZI, H.. *Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil*. Nova Odessa: Editora Plantarum, 1992.

MADADI, N.R.; ZONG, H.; KETKAR, A.; ZHENG, C.C.; PENTHALA, N.R.; JANGANATI, V.; BOMMAGANI, S.; EOFF, R.L.; GUZMANB, M.L.; CROOKS, P.A. Synthesis and evaluation of a series of resveratrol analogues as potent anti-cancer agents that target tubulin. *Med. Chem. Commun.*, 2015

MAIO, R.; BERTO, J.C.; CORRÊA, C.R.; CAMPANA, Á.O.; PAIVA, S.A.R.. Ingestão dietética, concentrações séricas e teciduais orais de carotenoides em pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade oral e da orofaringe. *Rev. Bras. Cancerol.* v.56, p.7-15, 2010.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B.. Biomonitorização do dano genético em humanos. *Genética Toxicológica*. Ed: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.. Porto Alegre: Editora Alcance, pp. 183-205, 2003.

MELBIUS, R.E.; KRAAL, G. Structure and function of the spleen. *Nat. Rev. Immunol.*, v. 5, p. 606-616, 2005.

MORRISON, S.J.; UCHIDA, N.; WEISMANN, I.L.. The biology of hematopoietic stem cells. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.*, v. 11, p. 35-71, 1995.

MURTHY, N.S.; MUKHERJEE, S.; RAY, G.; RAY, A.. Dietary factors and cancer chemEPrevention: an overview of obesity-related malignancies. *J. Postgrad. Med.* v.5, p.45-54, 2009.

NAGARAJU, A., LOKESH, B.R.. Interesterified coconut oil blends with groundnut oil or olive oil exhibit greater hypocholesterolemic effects compared with their respective physical blends in rats. *Nutr. Res.*, v.27, p.580-586, 2007.

NAVARRO, S.D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI, J.R.; GOMES, R.S.; KARAZIACK, C.B.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; ROMÃO, W.; JÚNIOR, V.L. MAURO, M.O.; OLIVEIRA, R.J.. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H isobenzofuran-1-one: Evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. *Eur. J. Med. Chem.*, v.75, p.132-142, 2014.

OLIVE, P. L.; WLODEK, D.; DURAND, R. E.; BANÁTH, P. Factors influencing DNA migration from individual cells subjected to gel electrophoresis. *Exper. Cell Res.*, v. 198, p. 259-267, 1992.

OLIVEIRA, R.; MATUO, R.; DASILVA, A.; MATIAZI, H.; MANTOVANI, M.; RIBEIRO, L.. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. *Toxicol. in Vitro*, v.21, p.41-52, 2007.

OLIVEIRA, R.; RIBEIRO, L.; DASILVA, A.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. *Toxicol. in Vitro*, v.20, p.1225-1233, 2006.

PAN, M.H.; HO, C.T. Chemopreventive effects of natural dietary compounds on cancer development. *Chem. Soc. Rev.*, v.37, p.2558-2574, 2008.

PASSARGE, E. Color atlas of genetics. 2Ed. Germany. Stuttgart - New York: Ed. Thieme. University of Essen, 2001.

PENNINGTON, J.A.T. Food composition databases for bioactive food components. *J. Food Comp. Anal.*, v.15, p.419-434, 2002.

PEZZUTO, J.M.. Plan-derived anticâncer agentes. *Biochem. Pharmacol.*, v.53, p.121-133, 1997.

RAFF, M.C. Social controls on cell survival and cell death. *Nature*, v. 356, p.397-400, 1992.

RAMOS, M.I.L.; RAMOS FILHO, M.M.; HIANE, P.A.; BRAGA NETO, J.A.; SIQUEIRA, E.M.A.. Qualidade nutricional da polpa de bocaiuva *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v.28, p.90-94, 2008.

ROBERFROID, M.. Functional food concept and its application to prebiotics. *Dig. Liver Dis.*, v.34, p.S105-S110, 2002.

RODRIGUES, H.S.. Obtenção de ésteres etílicos e metílicos, por reações de transesterificação, a partir do óleo da palmeira latino americana macaúba – *Acrocomia aculeata*. Tese (Doutorado em Química) Univeridade de São Paulo. Ribeirão Preto. 2007.

ROSS, G. M.; MCMILLAN, T. J.; WILCOS, P.; COLLINS, A. R.. The single cell microgel electrophoresis assay (comet assay): technical aspects and applications - Report on the 5th LH Gray Trust WorkshEP, Institute of Cancer Research in 1994. *Mutat. Res.*, v.337, p.57-60, 1995.

ROVOZZO, G.C.; BURKE, C.N. A manual of basic virological techniques. New Jersey: Prentice Hall, 1973. p. 159.

SANDERSON, C.J. Interleukin-5, eosinophils, and diseases. *Blood*, v. 79, p.3101-3109, 1992.

SCHMID, W. The micronuclei test. *Mutat. Res.*, v.31, p.9-15, 1975.

SHAHSAVANI, D.; KAZERANI, H.R.; KAVEH, S.; GHOLIPOUR-KANANI, H.. Determination of some normal serum parameters in starry sturgeon (*Acipenser stellatus* Pallas, 1771) during spring season. *Comp. Clin. Pathol.*, v.19, p. 57-61, 2010.

SILVA, J. B. da; MAGALHÃES, H. M.. Initiates in cancer control from Brazil's Ministry of Health. *Lancet Oncol.*, v.14, p.385-386, 2013.

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

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A.. Functional Food. Product development, marketing and consumer acceptance – a review. *Appetite*, v.51, p.456-467, 2008.

SNUSTAD, P.; SIMMONS, M.J.. Eds. *Fundamentos de Genética*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001: 756p.

SOUZA, P.H.M.; SOUZA-NETO, M.H.; MAIA, G.A.. Componentes funcionais nos alimentos. *Boletim da SBCTA*. v. 37, p. 127-135, 2003.

SPEIT, G.; HANELT, S.; HELBIG, R.; SEIDEL, A.; HARTMANN, A.. Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. *Toxicol. Let.*, v. 88, p. 91-98, 1996.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The cometaAssay (Single-Cell Gel Test), a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, D. S. *Methods in molecular biology: DNA repair protocols - Eukaryotic Systems*. Totowa: Humana Press. p.203-211. 1999

SUZUKI, H.; KATAYAMA, N.; IKWTA, Y.; MUKAI, K.; FUJIEDA, A.; MITANI, H.. Activities of granulocyte-macrophage colony – stimulating factor and interleukin-3 on monocytes. *Am. J. Hematol.*, v.75, p.179-189, 2004.

TICE, R.R.. The single cell gel/ Comet assay: a microgel eletrophoretic technique for the detection of DNA damage and repair in individual cells. In: PHILLIPS, D. H. E.; VENITT, S. *Environmental Mutagenesis*. Oxford: Bios Scientific Publishers, p.315-339. 1995.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI, Y. F.. The single cell gel/ comet assay: guidelines for in vitro e in vivo genetic toxicology testing. *Mutat. Res.*, v.35, p.206-221, 2000.

TUCKER, J.D.; PRESTON, R.J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. *Mutat. Res.*, v.365, n.1-3, p.147-159, 1996.

VELDERS, G.A.; FIBBE, W.E.. Involvement of proteases in cytokine-induced hematEpoietic stem cell mobilization. *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, v.1044, p.60-69, 2005.

VELOSO, H.P.; RANGEL F, A.L.R.; LIMA, J.C.A.. *Classificação da vegetação brasileira, adaptada a um sistema universal*. 1991. Disponível em; <<http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/monografias/GEBIS%20-%20RJ/classificacaovegetal.pdf>>. Acesso em: 22 mar. 2015.

VIEIRA, S.C.; LUSTOSA, A.M.L.; BARBOSA, C.N.B; TEIXEIRA, J.M.R.; BRITO, L.X.E.; SEARES, L.F.M.; FERREIRA, M.A.T. *Oncologia Básica*. 1Ed. Teresina, PI: Fundação Quixote, 2012.

VILLAVERDE, J.M.; SANCHES, L.; TERRA, V.A.; CECCHINI, R.; CECCHINI, A.L.; LUIZ, R.C.. Efeitos do óleo essencial do capim-limão (*Cymbopogon citratus* Stapf) sobre células humanas de melanoma (SK-MEL 147) e queratinócitos (HaCaT). *Biosaúde*, v. 15, p. 22-36, 2013.

WHO – World Health Organization. Cancer. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 22 mar. 2015.

XIE, J.H.; LIU, X.; SHEN, M.Y.; NIE, S.P.; ZHANG, H.; LI, C.; GONG, D.M.; XIE, M.Y.. Purification, physicochemical characterization and anticancer activity of a polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves. *Food Chem.*, v.136, p.1453–1460, 2013.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar as atividades (anti)genotóxica, (anti)mutagênica, imunomodulatória e apoptótica dos extratos da polpa e da amêndoa de *Acrocomia aculeata* em sistema *in vivo*.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Avaliar a atividade genotóxica e antigenotóxica dos extratos da polpa e da amêndoa de *Acrocomia aculeata*, respectivamente, isolados ou associados ao agente antitumoral ciclofosfamida;

Avaliar a mutagenicidade e a antimutagenicidade dos extratos da polpa e da amêndoa de *Acrocomia aculeata*, respectivamente, isolados ou associados ao agente antitumoral ciclofosfamida;

Avaliar a atividade imunomodulatória dos extratos da polpa e da amêndoa de *Acrocomia aculeata*, isolados ou em associação ao agente antitumoral ciclofosfamida;

Avaliar a atividade apoptótica dos óleos da polpa e da amêndoa de *Acrocomia aculeata*, isolados ou em associação ao agente antitumoral ciclofosfamida.

3. Manuscrito

***Acrocomia aculeata* previne danos toxicogénicos causados pelo agente antitumoral ciclofosfamida.**

Márcio Fernando Magosso^{1,2}, Pamela Castilho de Carvalho^{1,2}, Beatriz Ursinos Catelán Shneider^{1,2}, João Renato Pesarini^{1,2}, Perla Villani Borges da Silva³, Antônio Carlos Duenhas Monreal⁴, Andréa Luiza Cunha Laura⁴, Cândida Aparecida Leite Kassuya³, Rozanna Marques Muzzi³, Rodrigo Juliano Oliveira^{1,2,4}.

¹Centro de Estudos em Células Tronco, Terapia Celular e Genética Toxicológica - CeTRoGen, Núcleo de Hospital Universitário - NHU, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil;

²Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-Oeste, Faculdade Medicina - FAMED, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil;

³Programa de Mestrado em Ciência e Tecnologia Ambiental, Faculdade de Ciências Exatas e Tecnologia, Universidade Federal da Grande Dourados, Dourados, MS, Brasil.

⁴Programa de Mestrado em Farmácia, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde - CCBS, Universidade Federal de Mato Grosso do Sul - UFMS, Campo Grande, MS, Brasil;

Resumo

Acrocomia aculeata, rica em compostos antioxidantes, possui atividade anti-inflamatória, antidiabética e diurética, e no presente estudo foi avaliada quanto as suas capacidades (anti)genotóxicas, (anti)mutagênicas, imunomodulatórias e apoptóticas em associação com a ciclofosfamida. Foram utilizados 140 camundongos *Swiss* machos divididos nos grupos controles negativo, positivo (ciclofosfamida - 100 mg/kg); grupos que receberam somente os extratos da amêndoa (EA) e da polpa (EP) (3, 15 e 30 mg/kg) e grupos de tratamentos associados (extratos + ciclofosfamida) em protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento. Ambos Os extratos não são genotóxicos e nem mutagênicos. Os extratos são quimiopreventivos em todas as doses e protocolos testados e as porcentagens de redução de danos alcançaram 88,19% e 90,03% para o ensaio do cometa, e de até 69,73% e 70,93% para o ensaio do micronúcleo para EA e AP, respectivamente. Em relação aos ensaios de imunomodulação foi observado que os extratos possuem baixa atividade e no ensaio de apoptose verificou-se que os extratos reduzem a capacidade da ciclofosfamida causar apoptose nas células do fígado, baço e rim. Frente o exposto, infere-se que os extratos de *A. aculeata* podem compor alimentos funcionais/nutracêuticos com características quimiopreventivas. No entanto, não são fontes adequadas para a busca de coadjuvantes quimioterápicos, em especial, para o uso combinado com a agente antitumoral ciclofosfamida porque é capaz de diminuir a eficiência mutagênica e apoptótica do mesmo.

Palavras chave: quimioprevenção; bioantimutagênese; alimento funcional; nutracêutico; macaúba.

1. Introdução

É crescente a necessidade de compostos capazes de prevenir, curar ou tratar o câncer que já que essa é segunda causa de morte no mundo sendo superada apenas pelas doenças cardiovasculares (XIE *et al.*, 2013). Em relação aos novos compostos desenvolvidos para o tratamento das neoplasias, o ideal é que esses apresentem mais especificidade e seletividade pelas células tumorais e que tragam menos efeitos colaterais ao organismo (NAVARRO *et al.*, 2014).

A carcinogênese pode relacionar-se a ocorrência de danos toxicogênicos (MANTOVANI *et al.*, 2008) e uma maneira de prevenção é a utilização de produtos nutracêuticos (BACHUR *et al.*, 2007), com propriedades quimiopreventivas. Isso pode ser alcançado por meio de dietas enriquecidas com compostos que possam reduzir a ocorrência de danos genotóxicos e/ou mutagênicos (MALUF; ERDTMANN, 2003) já que a quimioprevenção visa inibir, estagnar ou reverter a carcinogênese inicial ou em progressão (BAEK *et al.*, 2009).

Uma grande quantidade de compostos bioativos é encontrada nas plantas e muitos deles são testados quanto à quimioprevenção (MANTOVANI *et al.*, 2008) no intuito de serem usados na prevenção do câncer. Dentre as plantas incluídas no rol de testes destaca-se a *Acrocomia aculeata*, é uma planta nativa das Américas do Sul e Central com propriedades medicinais (TRAESEL *et al.*, 2014) e nutracêuticas (LESCANO *et al.*, 2014) já descritas.

A. aculeata é popularmente denominada macaubeiro, bacaiúva, bocaiúva, coco-de-catarro, coco-de-espinho, imbocaiá, macaíva, macaúva, macujá, mocujá e umbocaiúva (LORENZI, 2006). Essa palmeira está amplamente distribuída no Brasil, no bioma Cerrado, e a sua ocorrência se dá em especial nos estados de Mato Grosso do Sul, São Paulo e Minas Gerais, sendo encontrada também no Paraná, Pará, Paraíba e Pernambuco (LANES *et al.*, 2015).

Relatos da medicina popular evidenciam o uso da polpa do fruto como laxativo e o seu óleo como analgésico, além do mesmo, juntamente com macerado de amêndoa ser usado no tratamento de afecções das vias respiratórias (LORENZI, 2006). Segundo Lescano *et al.* (2014) o óleo da polpa apresenta ação anti-inflamatória e diurética. Destaca-se ainda que os indígenas mexicanos usem as raízes dessa palmeira no

tratamento da diabetes (SOSNOWSKA; BALSLEV, 2008) e há ainda descrições sobre o uso cosmético para a hidratação e rejuvenescimento da pele (LIMA *et al.*, 2003) devido às suas características antioxidantes (COIMBRA; JORGE, 2011).

Sendo os antioxidantes uma importante classe dos quimiopreventivos (SIES, 1999), o presente estudo avaliou a capacidade dos extratos da polpa e da amêndoa de *A. aculeata* prevenir danos toxicogénicos causados pelo agente antitumoral ciclofosfamida bem como os seus efeitos imunomodulatórios e apoptóticos.

2. Material e Métodos

2.1. Coleta e identificação da planta

Os extratos da amêndoa e da polpa foram preparados a partir de frutos maduros coletados nos meses de março de 2010 a fevereiro de 2011, de espécimes localizados às margens da estrada entre Dourados a Panambizinho, região do Alto Café, distrito de Maracaju, Mato Grosso do Sul, latitude 21° 36' 52'' sul e longitude 55° 10' 06'' oeste, a 384m de altitude.

2.2. Obtenção dos Extratos

Os frutos foram lavados, descascados e escarificados, depois, secos em estufa de ventilação a 50°C por 2 h, posteriormente, as amêndoas e os fragmentos secos de polpa foram trituradas e armazenadas sob-refrigeração a 7° C.

Foram pesadas 500g de cada amostra seca às quais se adicionou 1 litro de hexano. As misturas foram transferidas para Kitassatos de 2000 mL, repousando ao abrigo da luz por sete dias. Em seguida foram submetidas à filtração e concentração em rotaevaporador a uma temperatura de 57° C (OETTERER, 2006).

Ambos os extratos, denominados a partir de agora de Extrato de Amêndoa (EA) e Extrato de Polpa (EP), permaneceram armazenados sob refrigeração a 4° C até o momento do uso.

2.3. Agentes Químicos

Como controle positivo foi utilizado quimioterápico Ciclofosfamida (Ítaca Laboratórios - Fosfaseron®, REG. M.S. No. 1.2603.0056.002-1; Batch 063020, Brazil), um agente alquilante de ação indireta, para a indução de danos no DNA. O mesmo foi preparado em solução fisiológica (NaCl 0,9%), pH 7,4 e administrado na concentração final de 100mg/Kg de peso corpóreo (*pc*), por via intraperitoneal (*ip*) em dose única (FEDEL-MIYASATO *et al.*, 2014a).

Os extratos (EA e EP) foram diluídos em Tween 4% e etanol 1% e administrados nas doses de 3, 15 e 30 mg/kg (*pc*) por gavagem (*vo*) (TRAESSEL *et al.*, 2014).

2.4. Animais

Foram utilizados 140 camundongos *Mus musculus* machos e sexualmente maduros da variedade *Swiss* com peso médio de 39g, provenientes do Biotério Central do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (CCBS/UFMS). Os animais foram mantidos em caixas de propileno recobertas por cepilho e alimentados com ração comercial (Nuvital®) e água filtrada *ad libitum*. Os animais foram mantidos sob condições padronizadas de climatização em estante ventilada (ALESCO®) com fotoperíodo de doze horas (12 horas de claro: 12 horas de escuro), temperatura em torno de $22 \pm 2^\circ\text{C}$ e umidade relativa de $55 \pm 10\%$. O experimento foi conduzido em concordância com as diretrizes da Declaração Universal dos Direitos dos Animais e com aprovação do Comitê de Ética no Uso de Animais da UFMS (Protocolo #399/2011).

2.5. Delineamento Experimental

Os camundongos foram divididos em 14 grupos, aos quais foram administrados os tratamentos e dosagens apresentados na Tabela 1:

Tabela 1. Grupos experimentais, dosagens e aplicação dos compostos.

Grupos Experimentais	Tratamento Inicial			Tratamento após 24 horas		
	Composto	Via	Dose	Composto	Via	Dose
C -	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
C +	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Ciclofosfamida	<i>ip</i>	100mg/kg <i>pc</i>	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
EA / EP 3	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	3mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
EA / EP 15	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	15mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
EA / EP 30	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	30mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
Pré 3	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	3mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Ciclofosfamida	<i>ip</i>	100mg/kg <i>pc</i>
Pré 15	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	15mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Ciclofosfamida	<i>ip</i>	100mg/kg <i>pc</i>
Pré 30	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	30mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>	Ciclofosfamida	<i>ip</i>	100mg/kg <i>pc</i>
Sim 3	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	3mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Ciclofosfamida	<i>ip</i>	100mg/kg <i>pc</i>	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
Sim 15	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	15mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Ciclofosfamida	<i>ip</i>	100mg/kg <i>pc</i>	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
Sim 30	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa	<i>vo</i>	30mg/Kg <i>pc</i>	Tween 4% + etanol 1%	<i>vo</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>
	Ciclofosfamida	<i>ip</i>	100mg/kg <i>pc</i>	Solução Fisiológica	<i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i>

Pós 3	Tween 4% + etanol 1% Ciclofosfamida	<i>vo</i> <i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i> 100mg/kg <i>pc</i>	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa Solução Fisiológica	<i>vo</i> <i>ip</i>	15mg/Kg <i>pc</i> 0,1ml/10g <i>pc</i>
Pós 15	Tween 4% + etanol 1% Ciclofosfamida	<i>vo</i> <i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i> 100mg/kg <i>pc</i>	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa Solução Fisiológica	<i>vo</i> <i>ip</i>	15mg/Kg <i>pc</i> 0,1ml/10g <i>pc</i>
Pós 30	Tween 4% + etanol 1% Ciclofosfamida	<i>vo</i> <i>ip</i>	0,1ml/10g <i>pc</i> 100mg/kg <i>pc</i>	Extrato da Amêndoa / Extrato da Polpa Solução Fisiológica	<i>vo</i> <i>ip</i>	15mg/Kg <i>pc</i> 0,1ml/10g <i>pc</i>

Legenda: C - - Grupo controle negativo; C + - Grupo controle positivo; EA / EP – Grupos tratados com o extrato da amêndoa ou extrato da polpa de *A. aculeata*; 3 – dose de 3mg/Kg; 15 - dose de 15mg/Kg; 30 – dose de 30mg/Kg; Pré – pré-tratamento; Sim – tratamento simultâneo; Pós – pós-tratamento, *vo* – via oral; *ip* – via intraperitoneal.

Após 24h (T1) da última administração dos compostos coletou-se duas amostras, de 20µL cada, de sangue periférico para realização do ensaio do cometa e micronúcleo. Novas coletas de sangue periférico (20µL) foram realizadas para o ensaio do micronúcleo também em 48h (T2) e 72h (T3) após a última administração dos compostos. Logo em seguida, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical para a coleta de baço, fígado e rins para os ensaios de fagocitose esplênica e de apoptose.

2.6. Avaliação toxicogenética

2.6.1 Ensaio do Cometa

Foi realizado o ensaio do cometa segundo as descrições de Singh *et al.* (1988) e Oliveira *et al.* (2013). Foram homogeneizados 20µL de sangue periférico em 120µL de agarose de baixo ponto de fusão (LPM) (0,75%). Em seguida essa solução foi depositada em lâminas previamente cobertas com agarose normal (1,5%). Recobriu-se o material biológico com lamínula de vidro. Posteriormente, as lâminas foram resfriadas a 4°C por 20 minutos. Fez-se então a remoção das lamínulas e a imersão das mesmas em solução de lise recentemente preparada, por 1 hora, à temperatura de 4°C, protegida da luz. Em seguida, as lâminas foram levadas à cuba de eletroforese com tampão de pH >13,0 por um período de 20 minutos à 4°C para desnaturação do DNA. Seguiu-se a eletroforese à 25,0V e 300,0mA (1,25V/cm) por 20 minutos. Em seguida, as lâminas foram neutralizadas com tampão pH 7,5 (0,4M Tris-HCl), durante 3 ciclos de 5 minutos cada, secas ao ar livre e fixadas em álcool etílico absoluto por 10 minutos. O material foi corado posteriormente (100,0µL de brometo de etídio - 20×10^{-3} mg/mL) e analisado em microscópio de epifluorescência (Bioval®) em aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Como descrito por Kobayashi *et al.* (1995), analisou-se 100 células por animal classificando-se os cometas em: (classe 0) células não danificadas que não apresentam cauda; (classe 1) células com cauda menor que o diâmetro do nucleóide; (classe 2) células com cauda de tamanho entre 1 e 2 vezes o diâmetro do nucleóide; (classe 3) células com cauda maior que 2 vezes o diâmetro do nucleóide. Células apoptóticas, que apresentavam nucleóide totalmente fragmentado,

não foram contabilizadas. O escore total foi calculado pela somatória dos valores resultantes da multiplicação do total de células observadas em cada classe de lesão as quais pertenciam pelo valor da classe.

2.6.2 *Ensaio do Micronúcleo em sangue periférico*

O ensaio do micronúcleo em sangue periférico foi realizado segundo Hayashi *et al.* (1990) com modificações de Oliveira *et al.* (2015). Uma alíquota de 20µL de sangue periférico foi colocada sobre uma lâmina previamente recoberta por 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL). Em seguida, depositou-se uma lamínula sobre o material biológico. A lâmina permaneceu em freezer (-20°C) por um período mínimo de duas semanas. A análise foi realizada em microscópio de epifluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A), no aumento de 400x, com filtro de excitação 420-490nm e filtro de barreira 520nm. Foram analisadas 2.000 células por animal.

2.7 *Imunomodulação*

2.7.1 *Ensaio de Fagocitose Esplênica*

Um fragmento de cerca de 1/3 do baço foi macerado em solução fisiológica formando uma suspensão, da qual 100µL foram colocadas em uma lâmina previamente corada com 20µL de Alaranjado de Acridina (1,0 mg/mL) e recoberta por uma lamínula. As lâminas foram estocadas em um *freezer* (-20°C) até o momento da análise, que foi feita em microscópio de fluorescência (Bioval®, Modelo L 2000A) em um aumento de 400x com filtro de 420-490nm e filtro de barreira de 520nm. Foram analisadas 200 células por animal e classificadas em ausência ou presença de fagocitose (DAVID *et al.*, 2014).

2.7.2 Contagem Diferencial de células do sangue

Vinte microlitros de sangue periférico foram utilizados para fazer a extensão sanguínea em lâminas de vidro. Essas foram secas a temperatura ambiente e coradas com *kit* Panótico (NEWProv®, lote 14429E) segundo instrução do fabricante. A leitura das lâminas foi feita por microscopia de campo claro em aumento de 1.000x, sendo analisadas 100 células/animal diferenciadas em linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (NAVARRO *et al.*, 2014).

2.8 Ensaio de Apoptose

Com 100µL de uma solução de macerado de baço, fígado ou rim, confeccionou-se uma extensão em lâmina de vidro. Após secas em temperatura ambiente, as lâminas foram fixadas em Carnoy por 5 minutos. Em seguida, submetidas a uma bateria de concentrações decrescentes de etanol (95%, 75%, 50% e 25%) seguida de lavagem com Tampão McIlvaine por 5 min., coloração com alaranjado de acridina (0,01%, 5 min.) e nova lavagem em tampão. Foram analisadas 100 células por animal. A identificação das células em apoptose se deu por meio da análise de padrões de fragmentação do DNA (NAVARRO *et al.*, 2014).

2.9 Cálculo da Porcentagem da Redução de Danos (RD%)

As porcentagens de redução de danos (RD%) foram calculadas pela seguinte fórmula (FEDEL-MIYASATO *et al.*, 2014a).

$$RD\% = \left(\frac{\text{Média do Controle Positivo} - \text{Média do Grupo Associado}}{\text{Média do Controle Positivo} - \text{Média do Controle Negativo}} \right) \times 100$$

2.10 Análise Estatística

Os valores apresentados foram expressos em média $\pm$ EPM (Erro Padrão da Média) e os dados foram analisados por Teste *t* não pareado bi caudal por meio do software *GraphPad Prism (Version 3.02; Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA)*. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Parâmetros Biométricos

Os pesos iniciais e finais dos animais não apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p > 0,05$) o que sugere ausência de toxicidade para os tratamentos realizados (Tabela 2).

3.3 Análise Toxicogenética

Tanto EA quanto EP não causam danos toxicogenéticos visto que as frequências de cometas e micronúcleos não aumentaram ($p > 0,05$) em relação ao controle negativo (Tabelas 3 e 4).

A atividade quimiopreventiva dos óleos foi comprovada em função das altas porcentagens de redução de danos observadas tanto no ensaio de antigenotoxicidade quanto no ensaio de antimutagenicidade para os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento nas três doses avaliadas (Tabela 3 e 4).

A análise da antigenotoxicidade de EA demonstrou porcentagens de redução de danos para os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento que variaram de 70,60-80,05%, 64,57-69,29% e 78,74-88,19%, respectivamente. Já para EP as porcentagens foram de 82,68-87,66%, 64,57-78,22% e 85,04-90,03%, respectivamente (Tabela 3).

A antimutagenicidade de EA demonstrou porcentagens de redução de danos para os protocolos de pré-tratamento, tratamento simultâneo e pós-tratamento que variaram de 59,11-61,66%, 40,89-68,69% e 57,19-68,05% para T1; 54,59-60,54%, 29,19-63,24%

e 47,57-69,73% para T2; e 37,84-58,56%, 26,13-56,76% e 50,45-64,86% para T3, respectivamente. Já para EP as porcentagens variaram de 60,70-70,93%, 12,14-42,49% e 61,98-67,09% para T1; 60,54-66,49%, 26,49-56,76% e 49,73-56,76% para T2; e 36,94-55,86%, 40,54-59,46% e 21,62-44,14% para T3, respectivamente. A análise estatística demonstrou eficiência do tratamento quimiopreventivo para todas as doses e protocolos excetuando-se: (I) a menor dose em pré-tratamento em T3 para EA; (II) a menor dose em tratamento simultâneo em T1; e (III) a dose intermediária em pós-tratamento em T3 (Tabela 4).

3.3 Imunomodulação

A administração dos extratos determinou aumento ($p < 0,05$) da ordem de 1,15x e 1,17x para EA e de 1,15x e 1,16x para EP, respectivamente. Em todas as doses e protocolos os extratos foram capazes de reduzir ($p < 0,05$) a taxa de fagocitose esplênica induzido pelo antitumoral (da ordem de 1,73x). Esse efeito foi mais pronunciado na maior dose do protocolo de pré-tratamento e na menor dose do tratamento simultâneo onde houve redução de 43,8 e 44,4 pontos percentuais se comparados ao grupo controle positivo para EA e EP, respectivamente. Já os menores efeitos, 8,6 e 7 pontos percentuais, foram observado na maior dose do protocolo de tratamento simultâneo de EA e EP, respectivamente (Tabela 5).

Na contagem diferencial de células do sangue do experimento EA observou-se: (I) discreta linfopenia ($p < 0,05$) para os grupos de pré-tratamento nas duas maiores doses, simultâneo na dose intermediária e pós-tratamento na maior dose; (II) discreta neutrofilia ($p < 0,05$) para o pré-tratamento nas duas maiores doses e na dose intermediária do tratamento simultâneo; (III) nenhuma diferença significativa ou valores diferentes dos de referência para monócitos, eosinófilos e basófilos, excetuando-se o grupo de pré-tratamento na dose intermediária que apresentou redução significativa de basófilos ($p < 0,05$) quando comparado ao grupo controle positivo (Tabela 6). Em relação ao EP verificou-se: (I) discreta linfopenia ($p < 0,05$) para os grupos EP e pré-tratamento na dose intermediária, e simultâneo e pós-tratamento na maior dose; (II) discreta neutrofilia ($p > 0,05$) para os grupos que receberam a dose intermediária de EP, as duas maiores doses em tratamento simultâneo e a maior dose em pós-tratamento; (III) quanto

aos monócitos, eosinófilos e basófilos não foram observados valores distintos dos de referencia (Tabela 6).

3.4 Apoptose

A administração de ciclofosfamida causou aumento da frequência de apoptose de 16,43x, 19x e 25,25x para baço, fígado e rins, respectivamente. A administração de EA e EP não causou nenhuma alteração na frequência de apoptose se comparado com o controle negativo. Os grupos associados, para ambos os óleos, em todas as doses e protocolos reduziram ($p < 0,05$) a frequência de apoptose causada pelo antitumoral ciclofosfamida, na ordem de até 57,5x para baço, 114x para fígado e 50,5x e para rins no tratamento com EA e de até 115x para baço, 57x para fígado e 101x para rins quando do tratamento com EP (Tabela 7).

4. Discussão

Como o câncer é uma das causas de morte mais frequentes no mundo (XIE *et al.*, 2013; WHO, 2015). Logo, identificar plantas medicinais e/ou nutracêuticas que sejam capazes de atuar na prevenção de danos no DNA que se correlacionam a gênese dessa doença é de grande importância para a saúde pública. Assim, plantas ou partes de plantas que possam ser consumidas diariamente, a baixos custos, e que sejam capazes de prevenir o desenvolvimento de tumores constituiriam uma importante classe de alimentos funcionais na atualidade.

Alimentos funcionais, ou nutracêuticos, são aqueles que contribuem para a manutenção do estado saudável diminuindo o risco de surgimento de patologias, pois possuem propriedades modulatórias de diversas funções orgânicas. Alguns dos principais tipos desses alimentos são os que possuem antioxidantes, substâncias capazes de reduzir ou inibir reações de oxidação como as provocadas pelas espécies reativas de oxigênio que causam lesões ao DNA, sendo considerados agentes inibidores de carcinogênese (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Dentre outras plantas, *A. aculeata* possui compostos bioativos de importância regular na dieta humana (BRESSAN *et al.*, 2009), como ácido oleico, β -caroteno e tocoferóis (COIMBRA; JORGE, 2011), fato que justificou a sua utilização em ensaios

relacionados à genotoxicidade e mutagenicidade, eventos que em conjunto podem originar câncer, além de imunomodulação e apoptose.

Os resultados apresentados neste trabalho demonstraram que EA e EP não são tóxicos visto que o peso dos animais não demonstrou variações importantes o que seria um indicativo inicial de toxicidade. Corroborar essa assertiva o fato de que os extratos também não induziram danos toxicogênicos visto não ter havido aumento da frequência de cometas e micronúcleos em nenhuma das doses testadas. Esses resultados corroboram o estudo de Traesel *et al.* (2014) que avaliaram o perfil toxicológico do extrato da polpa de *A. aculeata* em ensaios de toxicidade aguda e subaguda e demonstraram que a DL50 é superior a 2000mg/Kg e que as doses de 150-1000mg/Kg não alteram os parâmetros hematológicos, bioquímicos e histológicos dos animais.

Em relação aos ensaios de quimioprevenção observou-se que os extratos possuem tanto atividade antígeno-tóxica como antimutagênica comprovando assim o caráter quimiopreventivo em todos os protocolos testados. Todas as doses apresentaram capacidade de reduzir a frequência de cometas. Já em relação aos micronúcleos somente a menor dose em pré-tratamento (T3) com EA e a menor dose em tratamento simultâneo (T1) e a menor dose em pós-tratamento em (T3) em EP não apresentaram atividade quimiopreventiva. Frente ao exposto, considera-se que os extratos, que possuem de maneira geral altas porcentagens de redução de danos, são importantes agentes quimiopreventivos e podem agir tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese.

De acordo com Kada *et al.* (1982) a antimutagênese pode ocorrer por desmutagênese ou por bioantimutagênese. A desmutagênese se dá quando os compostos em testes impedem a ação dos agentes genotóxicos/mutagênicos, principalmente, por adsorção e, portanto, agem principalmente no meio extracelular. A bioantimutagênese é relativa à capacidade de correção de danos no DNA mediado por enzimas que atuam no reparo e na duplicação ou estimulando o reparo livre de erro ou ainda inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erros; e, portanto, acontece no meio intracelular (KADA; SHIMOI, 1987; OLIVEIRA *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007).

Em experimentos *in vivo* a literatura indica que o tratamento simultâneo avalia tanto desmutagênese como a bioantimutagênese; o pré-tratamento indicação modo de ação desmutagênico; e o pós-tratamento modo de ação bioantimutagênico, sendo necessário considerar a via de administração e o tempo de absorção dos alimentos/compostos em teste (PRIMO *et al.*, 2010; PESARINI *et al.*, 2014). Nesse contexto infere-se que o presente

estudo utilizou os protocolos recomendados pela literatura para classificar os modos de ação dos extratos de *A. aculeata* registrando-os assim de forma pioneira na literatura.

Além desses modos de ação a literatura ainda indica que a antimutagenese está diretamente correlacionada aos eventos de fagocitose esplênica. Em geral, observa-se que a indução danos ao DNA (evidenciados pelo aumento da frequência de cometas e micronúcleos) está diretamente relacionada ao aumento de fagocitose esplênica (ISHII *et al.* 2011; GONÇALVES *et al.*, 2014). Logo esse pode ser outro modo de redução da frequência de células lesionadas do organismo o que indicaria novo modo de ação e/ou comportamento do organismo para eliminar células com alterações genéticas. Esse fato é importante que existe uma estreita correlação, na literatura, entre o desenvolvimento do câncer e a mutagenese (LOUREIRO *et al.*, 2002).

Os dados da presente pesquisa suportam a assertiva que o agente antitumoral e os extratos, na menor e na maior dose, são capazes de estimular o aumento da fagocitose esplênica. No primeiro caso esse aumento significativo pode ser explicado pelo aumento do número de células com danos no DNA que foram confirmados pelos ensaios do cometa e de micronúcleo. No segundo caso, pode-se observar um aumento da fagocitose esplênica sem aumento do número de células com danos no DNA visto que o extrato não tem atividade toxicogenética (não é genotóxico e nem mutagênico). Esse fato sugere que o aumento da fagocitose esplênica possa ser mediado por mecanismos de imunomodulação e não somente como resposta a danos genotóxicos e mutagênicos que levariam ao aumento do número de macrófagos ativos nesse órgão (ISHII *et al.*, 2011; DAVID *et al.*, 2014; FEDEL-MIYASATO *et al.*, 2014b; GONÇALVES *et al.*, 2014). Quando é associada a ciclofosfamida com os extratos, nos diferentes protocolos e doses, percebe-se que os valores de fagocitose esplênica são intermediários entre os valores observados para os grupos tratados com os extratos isoladamente e o grupo tratado somente com a ciclofosfamida. Esses valores intermediários associados com as altas porcentagens de redução de danos sugerem que os principais modos antimutagênicos desses extratos se fazem por desmutagenese e bioantimutagenese e que a grande redução de células micronucleadas circulantes não se deve ao aumento de atividade esplênica.

Em relação à contagem diferencial de células do sangue não foram observadas alterações relevantes. Esse fato corrobora as inferências anteriores de que relatam baixa atividade imunomodulatória para os extratos testados.

Os extratos administrados isoladamente não induziram apoptose no baço, fígado ou rins, corroborando as afirmativas anteriores de que os extratos não são tóxicos. Já em relação aos protocolos de associação pode-se perceber que a frequência de apoptose em todos os órgãos reduziu significativamente se comparada ao controle positivo. Esse fato sugere que os extratos possuem uma alta atividade anti-apoptótica. Esse dado associado às altas porcentagens de redução de danos no DNA no protocolo de pós-tratamento confirma o modo de ação bioantimutagênico. A redução das frequências de apoptose permitem inferir que os danos genéticos ocasionados pelo antitumoral foram reparados antes que se acumulassem o suficiente para tornarem a célula inviável e se iniciasse processo apoptótico. Da mesma forma a observação das altas taxas de redução de danos observadas nos protocolos de pré-tratamento permite inferir a ação desmutagênica dos extratos, indicando que os mesmos impediram/inibiram a ação mutagênica da ciclofosfamida (OLIVEIRA *et al.*, 2006). Os protocolos de tratamento simultâneo não apontam qual das funcionalidades antimutagênicas ocorreu, mas corroboram a interpretação dos dois modos de ação supracitados.

Resultados semelhantes foram relatados por Oliveira *et al.* (2007) que observaram que a β -glucana, um importante agente antioxidante, também se apresentou antimutagênico e anti-apoptótico ao mesmo tempo. Esses resultados foram primeiramente observados em células CHO-k1 onde os autores descreveram os modos de ação desmutagênico e bioantimutagênico para o referido polissacarídeo sendo o último menos eficiente. No intuito de confirmar a bioantimutagênese os autores repetiram os ensaios com a célula CHO-xr5, linhagem deficiente em reparo de danos no DNA, e observaram ausência de atividade quimiopreventiva (antimutagênese) e aumento do número de apoptose. Logo esses fatos se devem a ausência de um eficiente sistema de reparo nessa linhagem celular.

Tal inferência pode ser estabelecida, pois, tal como a β -glucana é um agente antioxidante, os extratos aqui testados possuem antioxidantes em sua composição (COIMBRA e JORGE, 2011).

A ciclofosfamida é um agente alquilante do DNA com grande capacidade de formação de compostos intermediários com radicais livres, responsáveis por efeitos adversos no organismo, como a formação tardia de tumores secundários (LAURENCE *et al.*, 2012). Segundo Weijl *et al.*, (1998), esses efeitos poderiam ser minimizados com a administração concomitante de quimiopreventivos com ação antioxidante, visto que os

antineoplásicos agem por mecanismos que não agregam a formação de radicais livres para causar a morte das células cancerígenas e, portanto, os antioxidantes não diminuiriam a ação dos antitumorais; entretanto no presente trabalho a redução de danos mostrou-se alta também nos tratamentos simultâneos, indicando que além da ação antioxidante inferida aos extratos, os mesmos podem atuar por outras vias metabólicas. Nesse contexto é prudente relatar que os mesmos não devem ser usados como adjuvantes do tratamento com ciclofosfamida, pois inibem a ação da mesma.

Frente ao exposto, os dados da presente pesquisa permitem inferir que os extratos da amêndoa e da polpa de *A. aculeata* podem compor alimentos funcionais com características quimiopreventivas. Logo apresentam potencial nutracêuticos para a prevenção do câncer. No entanto, não são fontes adequadas para a busca de coadjuvantes quimioterápicos, em especial, para o uso combinado com a agente antitumoral ciclofosfamida porque é capaz de diminuir a eficiência mutagênica e apoptótica do mesmo.

5. Referências

BAEK, S.J.; MCENTEE, M.F.; LEGENDRE, A.M.. Review paper: cancer chemopreventive compounds and canine cancer. *Vet. Pathol.*, v.46, p.576–588, 2009.

BACHUR, J.A.; S.B.; GARCIA, VANNUCCHI, H.; JORDAO, A.A.; CHIARELLO, P.G.; ZUCOLOTO, S. Anti-oxidative systems in rat skeletal muscle after acute physical exercise. *Appl. Physiol. Nutr. Metab.*, v.32, p.190–196, 2007.

BRESSAN, J.; HERMSDORFF, H. H. M.; ZULET, M.. Á. Impacto hormonal e inflamatório de diferentes composições dietéticas: ênfase em padrões alimentares e fatores dietéticos específicos. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.*, v.53, p.572-581, 2009.

COIMBRA, M.C.; JORGE, N.. Proximate composition of guariroba (*Syagrus oleracea*), jerivá (*Syagrus romanzoffiana*) and macaúba (*Acrocomia aculeata*) palm fruits. *Food Res. Int.*, v.44, p.2139-2142, 2011.

DAVID, N.; MAURO, M.O.; GONÇALVES, C.A.; PESARINI, J.R.; STRAPASSON, R.L.B.; KASSUYA, C.A.L.; STEFANELLO, M.E.A.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; OLIVEIRA, R.J.. *Gochnatia polymorpha* ssp. *floccosa*: Bioprospecting of an anti-inflammatory phytotherapy for use during pregnancy. *J. Ethnopharmacol.*, v.11, p.370-379, 2014.

FEDEL-MIYASATO, L.E.S.; FORMAGIO, A.S.N.; AUHAREK, S.A.; KASSUYA, C.A.L.; NAVARRO, S.D.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; OLIVEIRA, R.J.. Antigenotoxic and antimutagenic effects of *Schinus terebinthifolius* Raddi in *Allium cepa* and Swiss mice: a comparative study. *Genet. Mol. Res.*, v.13, p.3411-3425, 2014a.

FEDEL-MIYASATO, L.E.S.; KASSUYA, C.A.L.; AUHAREK, S.A.; FORMAGIO, A.S.N.; CARDOSO, C.A.L.; MAURO, M.O.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; OLIVEIRA, R.J.. Evaluation of anti-inflammatory, immunomodulatory, chemopreventive and wound healing potentials from *Schinus terebinthifolius* methanolic extract. *Rev. Bras. Farmacog.*, v.24, p.565-575, 2014b.

GONÇALVES, C.A.; SILVA, N.L.; MAURO, M.O.; DAVID, N.; CUNHA-LAURA, A.L.; AUHAREK, S.A.; MONREAL, A.C.D.; VIEIRA, M.C.; SILVA, D.B.; SANTOS, F.J.L.; SIQUEIRA, J.M.; OLIVEIRA, R.J.. Evaluation of mutagenic, teratogenic, and immunomodulatory effects of *Annona nutans* hydromethanolic fraction on pregnant mice. *Genet. Mol. Res.*, v.13, p.4392-4405, 2014.

LAURENCE, L.; BRUNTON, D.; BJÖRN, C.K.; BRUCE, A.C.. *As Bases Farmacológicas da Terapêutica DE Goodman & Gilman*. 12Ed. Rio de Janeiro: ARTMED; 2012.

HAYASHI, M.; MORITA, T.; KODAMA, Y.; SOFUNI, T.; ISHIDATE-JUNIOR, M.. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orange-coated slides. *Mutat. Res.*, v.245, p.245-249, 1990.

ISHII, P.L.; PRADO, C.K.; MAURO, M.O.; CARREIRA, C.M.; MANTOVANI, M.S.; RIBEIRO, L.R.; DICHI, J.B.; OLIVEIRA, R.J.. Evaluation of *Agaricus blazei* in vivo for antigenotoxic, anticarcinogenic, phagocytic and immunomodulatory activities. *Regul. Toxicol. Pharm.*, v.59, p.412-422, 2011.

.KADA, T.; INOUE, T.; NAMIKI, N.. Environmental desmutagens and antimutagens. In: E. J. Klekowski (Ed.), *Environmental Mutagenesis and Plant Biology*, Praeger: NewYork, p.137-151, 1982.

KADA, T.; SHIMOI, K.. Desmutagens and bio-antimutagens - their modes of action. *Bioessays*, v.7, p.113-116, 1987.

KOBAYASHI, H.; SUGIYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. *MMS Commun.*, v.2, p.103-115, 1995.

LANES, E.C.M.; MOTOIKE, S.Y.; KUKI, K.N.; NICK, C.; FREITAS, R.D.. Molecular characterization and population structure of the Macaw Palm, *Acrocomia aculeata* (Arecaceae), ex situ germplasm collection using microsatellites markers. *J. Hered.*, v. 106, p.102-112, 2015.

LESCANO, C.H.; IWAMOTO, R.D.; SANJINEZ-ARGANDOÑA, E.J.; KASSUYA, C.A.L.. Diuretic and anti-Inflammatory activities of the microencapsulated *Acrocomia aculeata* (Arecaceae) oil on Wistar rats. J. Med. Food, In press, 2014.

LIMA, E.S.; FELFILI, J.M.; MARIMON, B.S.; SCARIOT, A.. Diversidade, estrutura e distribuição espacial de palmeiras em um cerrado sensu stricto no Brasil Central – DF. Rev. Brasil. Bot., v.26, p.361-370, 2003.

LORENZI, G. M. A. C. *Acrocomia aculeata* (Jacq.) Lodd. ex Mart. – Arecaceae: bases para o extrativismo sustentável. Tese (Doutorado em Ciências Agrárias). Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2006.

LOUREIRO, A.P.M.; MASCIO, P.D.; MEDEIROS, M.H.G.. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. Quim. Nova, v.25, p.777-793, 2002.

MANTOVANI, M.; BELLINI, M.; ANGELI, J.; OLIVEIRA, R.J.; SILVA, A.; RIBEIRO, L.. β -Glucans in promoting health: Prevention against mutation and cancer. Mutat. Res., v.658, p.154-161, 2008.

MALUF, S. W.; ERDTMANN, B.. Biomonitorização do dano genético em humanos. Genética Toxicológica. Ed: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P.. Porto Alegre: Editora Alcance, pp. 183-205, 2003.

NAVARRO, S.D.; BEATRIZ, A.; MEZA, A.; PESARINI, J.R.; GOMES, R.S.; KARAZIACK, C.B.; CUNHA-LAURA, A.L.; MONREAL, A.C.D.; ROMÃO, W.; JÚNIOR, V.L. MAURO, M.O.; OLIVEIRA, R.J.. A new synthetic resorcinolic lipid 3-Heptyl-3,4,6-trimethoxy-3H isobenzofuran-1-one: evaluation of toxicology and ability to potentiate the mutagenic and apoptotic effects of cyclophosphamide. Eur. J. Med. Chem., v.75, p.132-142, 2014.

OETTERER, M.; REGITANDO-D`ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H.F.. Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos. Barueri, SP: Manole, 2006.

OLIVEIRA, R.J.; MANTOVANI, M.S.; PESARINI, J.R.; MAURO, M.O.; SILVA, A.F.; SOUZA, T.R.; RIBEIRO, L.R.. 6-dimethylaminopurine and cyclohexamide are mutagenic and later reproductive performance and intrauterine development in vivo. Genet. Mol. Res., v.14, p.834-849, 2015.

OLIVEIRA, R.; MATUO, R.; DASILVA, A.; MATIAZI, H.; MANTOVANI, M.; RIBEIRO, L.. Protective effect of β -glucan extracted from *Saccharomyces cerevisiae*, against DNA damage and cytotoxicity in wild-type (k1) and repair-deficient (xrs5) CHO cells. Toxicol. in Vitro, v.21, p.41-52, 2007.

OLIVEIRA, R.J.; SALLES, M.J.S.; SILVA, A.F.; KANNO, T.Y.NAKAMURA; LOURENÇO, A.C.S.; LOURENÇO, A.C.S.; LEITE, V.S.; MATIAZI, H.J.; PESARINI, J.R.; RIBEIRO, L.R.; MANTOVANI, M.S.. In vivo evaluation of the antimutagenic and antigenotoxic effects of β -glucan extracted from *Saccharomyces*

cerevisiae in acute treatment with multiple doses. Genet. Mol. Biol., v.36, p.413-424, 2013.

OLIVEIRA, R.; RIBEIRO, L.; DASILVA, A.; MATUO, R.; MANTOVANI, M.. Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of β -glucan from barley, in CHO-k1 and HTC cell lines using the micronucleus test. Toxicol. in Vitro, v.20, p.1225-1233, 2006.

PESARINI, J.R.; VICTORELLI, S.G.; VICENTINI, A.P.; FERREIRA, L.K.; MAURO, M.O.; MATUO, R.; OLIVEIRA, J.R.; ANTONIOLLI, A.C.M.B.; MANTOVANI, M.S.; OLIVEIRA, R.J.. Antigenotoxic and antimutagenic effects of glutamine supplementation on mice treated with cisplatin. Genet. Mol. Res., v.13, p.4820-4830, 2014.

PRIMO, M. S. ; CALLIARI, C. M. ; CASTRO-GOMEZ, R. J. H. ; MAURO, M. O. ; MANTOVANI, M. S. ; OLIVEIRA, R. J.. Avaliação da mutagenicidade e da antimutagenicidade de um biopolímero extraído do microrganismo *Agrobacterium radiobacter* em camundongos Swiss. Rev.a Bras. Farmacog., v.20, p.340-347, 2010.

SIES, H.. Strategies of antioxidant defense. Eur. J. Biochem., v,215, p.213-219, 1999.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L.. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exper. Cell Res., v.175, p.184-191, 1988.

SOSNOWSKA, J.; BALSLEV, H.. American palms used for medicine, in the ethnobotanical and pharmacological publications. Rev. Peru. Biol., v.5, p.143-146. 2008.

TRAESEL, G.K; SOUZA, J.C.; BARROS, A.L.; SOUZA, M.A.; SCHMITZ, O.; MUZZI, R.M.; OESTERREICH, S.A.; ARENA, A.C.. Acute and subacute (28 days) oral toxicity assessment of the oil extracted from *Acrocomia aculeata* pulp in rats. Food Chem. Toxicol., v.74, p. 320-325, 2014.

WEIJL, N.I.; WIPKINK-BAKKER, A.; LENTJES, E.G.W.M.; BERGER, H.M.; CLETON, F.J.; OSANTO, S.. Cisplatin combination chemotherapy induces a fall in plasma antioxidants of cancer patients. Ann. Oncol., v.9, p.1331-1337, 1998.

WHO – World Health Organization. Cancer. 2015. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>. Acesso em 22 mar. 2015.

XIE, J.H.; LIU, X.; SHEN, M.Y.; NIE, S.P.; ZHANG, H.; LI, C.; GONG, D.M.; XIE, M.Y.. Purification, physicochemical characterization and anticancer activity of a polysaccharide from *Cyclocarya paliurus* leaves. Food Chem., v.136, p.1453-1460, 2013.

Tabela 2. Valores Médios $\pm$ EPM dos Pesos Inicial e Final dos animais tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.

Grupos Experimentais	Animais tratados com EA		Animais tratados com EP	
	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)
C -	39,20 $\pm$ 3,71	40,00 $\pm$ 3,58	39,20 $\pm$ 3,71	40,00 $\pm$ 3,58
C +	38,80 $\pm$ 1,47 ^a	40,20 $\pm$ 1,33 ^a	38,80 $\pm$ 1,47 ^a	40,20 $\pm$ 1,33 ^a
O 3	40,80 $\pm$ 1,72 ^a	41,00 $\pm$ 1,10 ^a	38,80 $\pm$ 1,17 ^a	38,40 $\pm$ 1,36 ^a
O15	40,40 $\pm$ 1,50 ^a	39,60 $\pm$ 1,02 ^a	39,80 $\pm$ 1,17 ^a	40,20 $\pm$ 1,60 ^a
O30	39,60 $\pm$ 1,62 ^a	39,40 $\pm$ 1,36 ^a	38,80 $\pm$ 1,72 ^a	39,80 $\pm$ 1,47 ^a
Pré 3	39,40 $\pm$ 2,06 ^b	39,40 $\pm$ 2,24 ^b	42,20 $\pm$ 1,47 ^b	39,80 $\pm$ 1,72 ^b
Pré 15	39,60 $\pm$ 3,32 ^b	38,40 $\pm$ 3,14 ^b	39,40 $\pm$ 1,50 ^b	39,60 $\pm$ 1,50 ^b
Pré 30	39,80 $\pm$ 0,40 ^b	39,60 $\pm$ 1,36 ^b	39,20 $\pm$ 0,75 ^b	39,40 $\pm$ 1,50 ^b
Sim 3	39,80 $\pm$ 1,17 ^b	39,20 $\pm$ 1,33 ^b	41,20 $\pm$ 1,17 ^b	40,60 $\pm$ 1,74 ^b
Sim 15	39,60 $\pm$ 1,02 ^b	39,20 $\pm$ 1,60 ^b	40,00 $\pm$ 1,10 ^b	40,40 $\pm$ 0,80 ^b
Sim 30	40,20 $\pm$ 1,17 ^b	40,40 $\pm$ 1,02 ^b	41,80 $\pm$ 1,33 ^b	40,40 $\pm$ 2,24 ^b
Pós 3	39,00 $\pm$ 0,89 ^b	38,80 $\pm$ 0,75 ^b	39,40 $\pm$ 1,50 ^b	37,80 $\pm$ 2,14 ^b
Pós 15	39,80 $\pm$ 1,47 ^b	39,60 $\pm$ 2,65 ^b	41,20 $\pm$ 1,47 ^b	40,40 $\pm$ 0,49 ^b
Pós 30	40,80 $\pm$ 0,98 ^b	39,60 $\pm$ 1,85 ^b	41,80 $\pm$ 1,33 ^b	40,80 $\pm$ 0,75 ^b

EPM: Erro Padrão da Média. Letra ^a indica grupo comparado ao Controle Negativo, letra ^b indica grupo comparado ao Controle Positivo e * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabela 3. Valores médios $\pm$ EPM da frequência de células com danos no DNA, distribuição entre as classes de danos e escore referentes aos testes de (anti)genotoxicidade do ensaio do cometa em sangue periférico de camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.

Grupos Experimentais	Células com danos no DNA	Classes de Danos				Escore	% R D.
		0	1	2	3		
Extrato da Amêndoa							
C -	10,40 $\pm$ 1,85	89,60 $\pm$ 1,85	10,40 $\pm$ 1,85	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	10,40 $\pm$ 1,85	-
C +	86,60 $\pm$ 2,58 ^{a*}	13,40 $\pm$ 2,58	37,80 $\pm$ 5,23	25,40 $\pm$ 3,26	23,40 $\pm$ 1,62	158,80 $\pm$ 5,67 ^{a*}	-
O 3	7,00 $\pm$ 3,29 ^a	93,00 $\pm$ 3,29	6,60 $\pm$ 3,01	0,40 $\pm$ 0,80	0,00 $\pm$ 0,00	7,40 $\pm$ 3,72 ^a	-
O15	11,60 $\pm$ 3,38 ^a	88,40 $\pm$ 3,38	8,20 $\pm$ 2,40	2,60 $\pm$ 1,36	0,80 $\pm$ 0,75	15,80 $\pm$ 5,56 ^a	-
O30	11,40 $\pm$ 7,34 ^a	88,60 $\pm$ 7,34	6,00 $\pm$ 4,56	4,00 $\pm$ 2,19	1,40 $\pm$ 1,36	18,20 $\pm$ 11,75 ^a	-
Pré 3	32,40 $\pm$ 3,88 ^{b*}	67,60 $\pm$ 3,88	20,60 $\pm$ 5,12	9,00 $\pm$ 2,28	2,80 $\pm$ 1,47	47,00 $\pm$ 4,47 ^{b*}	71,13
Pré 15	32,80 $\pm$ 4,26 ^{b*}	67,20 $\pm$ 4,26	17,80 $\pm$ 2,32	11,20 $\pm$ 1,72	3,80 $\pm$ 2,32	51,60 $\pm$ 8,28 ^{b*}	70,60
Pré 30	25,60 $\pm$ 3,93 ^{b*}	74,40 $\pm$ 3,93	14,80 $\pm$ 1,47	6,60 $\pm$ 1,50	4,20 $\pm$ 2,40	40,60 $\pm$ 8,64 ^{b*}	80,05
Sim 3	35,60 $\pm$ 5,68 ^{b*}	64,40 $\pm$ 5,68	21,60 $\pm$ 1,85	9,20 $\pm$ 2,71	4,80 $\pm$ 3,66	54,40 $\pm$ 14,15 ^{b*}	66,93
Sim 15	37,40 $\pm$ 5,35 ^{b*}	62,60 $\pm$ 5,35	23,20 $\pm$ 2,79	9,80 $\pm$ 5,64	4,40 $\pm$ 3,26	56,00 $\pm$ 12,33 ^{b*}	64,57
Sim 30	33,80 $\pm$ 12,64 ^{b*}	66,20 $\pm$ 12,64	22,20 $\pm$ 6,76	8,40 $\pm$ 4,32	3,20 $\pm$ 2,32	48,60 $\pm$ 20,77 ^{b*}	69,29
Pós 3	26,60 $\pm$ 9,20 ^{b*}	73,40 $\pm$ 9,20	17,20 $\pm$ 3,19	5,80 $\pm$ 4,58	3,60 $\pm$ 2,94	39,60 $\pm$ 18,83 ^{b*}	78,74
Pós 15	23,00 $\pm$ 3,16 ^{b*}	77,00 $\pm$ 3,16	16,40 $\pm$ 2,58	4,20 $\pm$ 2,14	2,40 $\pm$ 1,50	32,00 $\pm$ 4,77 ^{b*}	83,46
Pós 30	19,40 $\pm$ 8,82 ^{b*}	80,60 $\pm$ 8,82	11,20 $\pm$ 4,71	6,80 $\pm$ 3,37	1,40 $\pm$ 1,50	29,00 $\pm$ 14,30 ^{b*}	88,19
Extrato da Polpa							
C -	10,40 $\pm$ 1,85	89,60 $\pm$ 1,85	10,40 $\pm$ 1,85	0,00 $\pm$ 0,00	0,00 $\pm$ 0,00	10,40 $\pm$ 1,85	-
C +	86,60 $\pm$ 2,58 ^{a*}	13,40 $\pm$ 2,58	37,80 $\pm$ 5,23	25,40 $\pm$ 3,26	23,40 $\pm$ 1,62	158,80 $\pm$ 5,67 ^{a*}	-
O 3	10,60 $\pm$ 2,58 ^a	89,40 $\pm$ 2,58	7,80 $\pm$ 1,72	2,00 $\pm$ 0,63	0,80 $\pm$ 0,75	14,20 $\pm$ 4,45 ^a	-
O15	6,80 $\pm$ 3,31 ^a	93,20 $\pm$ 3,31	5,00 $\pm$ 2,76	1,60 $\pm$ 0,49	0,20 $\pm$ 0,40	8,80 $\pm$ 4,12 ^a	-
O30	8,60 $\pm$ 2,42 ^a	91,40 $\pm$ 2,42	6,40 $\pm$ 1,20	1,80 $\pm$ 0,98	0,40 $\pm$ 0,49	11,20 $\pm$ 4,12 ^a	-
Pré 3	22,40 $\pm$ 4,76 ^{b*}	77,60 $\pm$ 4,76	16,00 $\pm$ 2,45	5,20 $\pm$ 1,47	1,20 $\pm$ 1,17	30,00 $\pm$ 8,27 ^{b*}	84,25
Pré 15	23,60 $\pm$ 2,15 ^{b*}	76,40 $\pm$ 2,15	16,60 $\pm$ 1,74	5,60 $\pm$ 0,80	1,40 $\pm$ 0,49	32,00 $\pm$ 3,16 ^{b*}	82,68

Pré 30	19,80	4,45 ^{b*}	80,20 ± 4,45	13,60 ± 2,73	4,00 ± 1,26	2,20 ± 1,47	28,20 ± 8,08 ^{b*}	87,66
Sim 3	37,40	4,80 ^{b*}	62,60 ± 4,80	20,20 ± 1,94	12,20 ± 2,23	5,00 ± 1,79	59,60 ± 9,18 ^{b*}	64,57
Sim 15	27,60	1,74 ^{b*}	72,40 ± 1,74	15,40 ± 1,85	7,80 ± 0,98	4,40 ± 0,49	44,20 ± 1,94 ^{b*}	77,43
Sim 30	27,00	5,73 ^{b*}	73,00 ± 5,73	18,00 ± 3,63	5,40 ± 2,87	3,60 ± 1,62	39,60 ± 10,8 ^{b*}	78,22
Pós 3	21,80	5,23 ^{b*}	78,20 ± 5,23	16,00 ± 2,45	3,20 ± 1,72	2,60 ± 1,96	30,20 ± 10,34 ^{b*}	85,04
Pós 15	20,60	3,72 ^{b*}	79,40 ± 3,72	15,80 ± 1,33	3,80 ± 2,79	1,00 ± 0,63	26,40 ± 7,06 ^{b*}	86,61
Pós 30	18,00	6,54 ^{b*}	82,00 ± 6,54	11,40 ± 6,62	4,20 ± 1,60	2,40 ± 1,36	27,00 ± 8,00 ^{b*}	90,03

EPM: Erro Padrão da Média. % RD: Porcentagem de Redução de Danos. Letra ^a indica grupo comparado ao Controle Negativo, letra ^b indica grupo comparado ao Controle Positivo e * indica diferença estatisticamente significativa (p < 0.05).

Tabela 4. Frequência total e valores médios $\pm$ EPM referentes ao ensaio de micronúcleo em sangue periférico de camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.

Grupos Experimentais	Frequência de Micronúcleos			Média $\pm$ EPM			% RD 24h	% RD 48h	% RD 72h
	24h (T1)	48h (T2)	72h (T3)	24h (T1)	48h (T2)	72h (T3)			
Extrato da Amêndoa									
C -	73	61	50	14,60 $\pm$ 2,15	12,20 $\pm$ 1,94	10,00 $\pm$ 1,41	-	-	-
C +	386	246	161	77,20 $\pm$ 7,83 ^{a*}	49,20 $\pm$ 3,49 ^{a*}	32,20 $\pm$ 3,54 ^{a*}	-	-	-
O 3	56	51	49	11,20 $\pm$ 1,94 ^a	10,20 $\pm$ 1,72 ^a	9,80 $\pm$ 0,75 ^a	-	-	-
O15	57	53	47	11,40 $\pm$ 1,74 ^a	10,60 $\pm$ 2,06 ^a	9,40 $\pm$ 1,74 ^a	-	-	-
O30	74	61	48	14,80 $\pm$ 4,26 ^a	12,20 $\pm$ 2,79 ^a	9,60 $\pm$ 2,24 ^a	-	-	-
Pré 3	193	134	119	38,60 $\pm$ 4,03 ^{b*}	26,80 $\pm$ 3,31 ^{b*}	23,80 $\pm$ 16,41 ^b	61,66	60,54	37,84
Pré 15	201	145	98	40,20 $\pm$ 2,14 ^{b*}	29,00 $\pm$ 2,45 ^{b*}	19,60 $\pm$ 1,50 ^{b*}	59,11	54,59	56,76
Pré 30	197	141	96	39,40 $\pm$ 1,74 ^{b*}	28,20 $\pm$ 1,33 ^{b*}	19,20 $\pm$ 2,71 ^{b*}	60,38	56,76	58,56
Sim 3	258	192	132	51,60 $\pm$ 3,98 ^{b*}	38,40 $\pm$ 6,41 ^{b*}	26,40 $\pm$ 1,85 ^{b*}	40,89	29,19	26,13
Sim 15	209	143	98	41,80 $\pm$ 2,79 ^{b*}	28,60 $\pm$ 3,26 ^{b*}	19,60 $\pm$ 1,74 ^{b*}	56,55	55,68	56,76
Sim 30	171	129	104	34,20 $\pm$ 2,14 ^{b*}	25,80 $\pm$ 1,94 ^{b*}	20,80 $\pm$ 1,17 ^{b*}	68,69	63,24	51,35
Pós 3	207	158	105	41,40 $\pm$ 4,59 ^{b*}	31,60 $\pm$ 1,85 ^{b*}	21,00 $\pm$ 1,41 ^{b*}	57,19	47,57	50,45
Pós 15	173	117	102	34,60 $\pm$ 3,44 ^{b*}	23,40 $\pm$ 3,90 ^{b*}	20,40 $\pm$ 3,61 ^{b*}	68,05	69,73	53,15
Pós 30	176	128	89	35,20 $\pm$ 2,32 ^{b*}	25,60 $\pm$ 2,58 ^{b*}	17,80 $\pm$ 1,83 ^{b*}	67,09	63,78	64,86
Extrato da Polpa									
C -	73	61	50	14,60 $\pm$ 2,15	12,20 $\pm$ 1,94	10,00 $\pm$ 1,41	-	-	-
C +	386	246	161	77,20 $\pm$ 7,83 ^{a*}	49,20 $\pm$ 3,49 ^{a*}	32,20 $\pm$ 3,54 ^{a*}	-	-	-
O 3	78	45	38	15,60 $\pm$ 6,41 ^a	9,00 $\pm$ 2,00 ^a	7,60 $\pm$ 3,07 ^a	-	-	-
O15	65	42	35	13,00 $\pm$ 3,90 ^a	8,40 $\pm$ 2,58 ^a	7,00 $\pm$ 3,29 ^a	-	-	-
O30	54	53	50	10,80 $\pm$ 6,49 ^a	10,60 $\pm$ 1,74 ^a	10,00 $\pm$ 1,41 ^a	-	-	-
Pré 3	196	134	101	39,20 $\pm$ 9,91 ^{b*}	26,80 $\pm$ 3,87 ^{b*}	20,20 $\pm$ 1,72 ^{b*}	60,70	60,54	54,05
Pré 15	164	133	120	32,80 $\pm$ 5,95 ^{b*}	26,60 $\pm$ 2,87 ^{b*}	24,00 $\pm$ 4,34 ^{b*}	70,93	61,08	36,94

Pré 30	175	123	99	35,00 ± 12,65 ^{b*}	24,60 ± 1,62 ^{b*}	19,80 ± 1,33 ^{b*}	67,41	66,49	55,86
Sim 3	348	197	116	69,60 ± 9,91 ^b	39,40 ± 3,61 ^{b*}	23,20 ± 3,31 ^{b*}	12,14	26,49	40,54
Sim 15	296	165	111	59,20 ± 7,91 ^{b*}	33,00 ± 4,60 ^{b*}	22,20 ± 3,37 ^{b*}	28,75	43,78	45,05
Sim 30	253	141	95	50,60 ± 6,92 ^{b*}	28,20 ± 2,56 ^{b*}	19,00 ± 2,28 ^{b*}	42,49	56,76	59,46
Pós 3	183	147	137	36,60 ± 3,20 ^{b*}	29,40 ± 2,06 ^{b*}	27,40 ± 2,33 ^b	64,86	53,51	21,62
Pós 15	192	154	124	38,40 ± 5,68 ^{b*}	30,80 ± 4,79 ^{b*}	24,80 ± 3,76 ^{b*}	61,98	49,73	33,33
Pós 30	176	141	112	35,20 ± 4,17 ^{b*}	28,20 ± 3,82 ^{b*}	22,40 ± 1,96 ^{b*}	67,09	56,76	44,14

EPM: Erro Padrão da Média. % RD: Porcentagem de Redução de Danos. Letra ^a indica grupo comparado ao Controle Negativo, letra ^b indica grupo comparado ao Controle Positivo e * indica diferença estatisticamente significativa (p < 0.05).

Tabela 5. Número total, frequência média $\pm$ EPM e porcentagem de células com evidência de fagocitose esplênica em camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.

	Número de Células Analisadas	Total de Células com Evidência de Fagocitose					
		Extrato da Amêndoa			Extrato da Polpa		
		Valores Absolutos	Média $\pm$ EPM	Porcentagem (%)	Valores Absolutos	Média $\pm$ EPM	Porcentagem (%)
C -	1000	439	87,80 $\pm$ 4,31	43,90	439	87,80 $\pm$ 4,31	43,90
C +	1000	760	152,00 $\pm$ 4,69 ^{a*}	76,00	760	152,00 $\pm$ 4,69 ^{a*}	76,00
O 3	1000	505	101,00 $\pm$ 3,03 ^{a*}	50,50	506	101,20 $\pm$ 1,17 ^{a*}	50,60
O15	1000	475	95,00 $\pm$ 4,77 ^a	47,50	474	94,80 $\pm$ 8,13 ^a	47,40
O30	1000	513	102,60 $\pm$ 5,85 ^{a*}	51,30	507	101,40 $\pm$ 2,58 ^{a*}	50,70
Pré 3	1000	582	116,40 $\pm$ 5,31 ^{b*}	58,20	566	113,20 $\pm$ 4,84 ^{b*}	56,60
Pré 15	1000	553	110,60 $\pm$ 4,80 ^{b*}	55,30	545	109,00 $\pm$ 7,24 ^{b*}	54,50
Pré 30	1000	541	108,20 $\pm$ 5,31 ^{b*}	54,10	538	107,60 $\pm$ 4,84 ^{b*}	53,80
Sim 3	1000	542	108,40 $\pm$ 7,00 ^{b*}	54,20	501	100,20 $\pm$ 2,99 ^{b*}	50,10
Sim 15	1000	657	131,40 $\pm$ 4,27 ^{b*}	65,70	667	133,40 $\pm$ 7,50 ^{b*}	66,70
Sim 30	1000	717	143,40 $\pm$ 9,39 ^b	71,70	725	145,00 $\pm$ 7,29 ^b	72,50
Pós 3	1000	591	118,20 $\pm$ 5,91 ^{b*}	59,10	600	120,00 $\pm$ 5,10 ^{b*}	60,00
Pós 15	1000	631	126,20 $\pm$ 6,08 ^{b*}	63,10	638	127,60 $\pm$ 8,96 ^{b*}	63,80
Pós 30	1000	638	127,60 $\pm$ 8,45 ^{b*}	63,80	631	126,20 $\pm$ 8,13 ^{b*}	63,10

EPM: Erro Padrão da Média. Letra ^a indica grupo comparado ao Controle Negativo, letra ^b indica grupo comparado ao Controle Positivo e * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabela 6. Valores de referência e média $\pm$ EPM relativas à contagem diferencial de células do sangue de camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.

Tipo de Célula	Linfócito	Neutrófilo	Monócito	Eosinófilo	Basófilo	
Valores de Referência	55 - 95%	10 - 40%	0,1 - 3,5%	0 - 0,4%	0 - 0,3%	
Grupos Experimentais	Extrato da Amêndoa					
	C -	57,00 $\pm$ 2,76	37,60 $\pm$ 2,42	3,20 $\pm$ 0,75	1,60 $\pm$ 0,80	0,60 $\pm$ 0,80
	C +	57,20 $\pm$ 1,33 ^a	37,00 $\pm$ 0,63 ^a	3,00 $\pm$ 0,89 ^a	1,60 $\pm$ 0,49 ^a	1,20 $\pm$ 0,40 ^a
	O 03	56,20 $\pm$ 2,14 ^a	39,40 $\pm$ 1,50 ^a	2,80 $\pm$ 0,75 ^a	1,00 $\pm$ 0,63 ^a	0,60 $\pm$ 0,80 ^a
	O 15	56,00 $\pm$ 1,90 ^a	39,80 $\pm$ 3,19 ^a	2,60 $\pm$ 0,80 ^a	1,00 $\pm$ 0,63 ^a	0,60 $\pm$ 0,80 ^a
	O 30	57,20 $\pm$ 1,33 ^a	37,60 $\pm$ 1,50 ^a	3,20 $\pm$ 0,75 ^a	1,40 $\pm$ 0,80 ^a	0,60 $\pm$ 0,49 ^a
	Pré 03	56,40 $\pm$ 1,02 ^b	38,00 $\pm$ 1,41 ^b	3,00 $\pm$ 0,63 ^b	2,20 $\pm$ 0,98 ^b	0,40 $\pm$ 0,49 ^b
	Pré 15	53,60 $\pm$ 1,85 ^{b*}	42,40 $\pm$ 2,73 ^{b*}	2,80 $\pm$ 0,75 ^b	1,00 $\pm$ 0,89 ^b	0,20 $\pm$ 0,40 ^{b*}
	Pré 30	51,80 $\pm$ 1,60 ^{b*}	43,00 $\pm$ 2,61 ^{b*}	3,00 $\pm$ 0,89 ^b	1,60 $\pm$ 1,02 ^b	0,60 $\pm$ 0,80 ^b
	Sim 03	55,80 $\pm$ 3,29 ^b	39,00 $\pm$ 3,29 ^b	2,80 $\pm$ 1,17 ^b	2,00 $\pm$ 0,63 ^b	0,40 $\pm$ 0,80 ^b
	Sim 15	53,60 $\pm$ 1,02 ^{b*}	42,60 $\pm$ 2,42 ^{b*}	2,20 $\pm$ 0,98 ^b	1,20 $\pm$ 0,75 ^b	0,40 $\pm$ 0,49 ^b
	Sim 30	56,20 $\pm$ 2,48 ^b	38,60 $\pm$ 2,73 ^b	2,80 $\pm$ 0,75 ^b	1,80 $\pm$ 0,40 ^b	0,60 $\pm$ 0,49 ^b
	Pós 03	56,60 $\pm$ 1,85 ^b	38,00 $\pm$ 2,10 ^b	3,40 $\pm$ 0,80 ^b	1,20 $\pm$ 0,75 ^b	0,80 $\pm$ 0,75 ^b
	Pós 15	57,80 $\pm$ 2,14 ^b	37,20 $\pm$ 2,04 ^b	2,60 $\pm$ 0,80 ^b	1,80 $\pm$ 0,40 ^b	0,60 $\pm$ 0,49 ^b
	Pós 30	54,60 $\pm$ 1,36 ^{b*}	39,40 $\pm$ 1,85 ^b	3,60 $\pm$ 0,49 ^b	1,60 $\pm$ 0,80 ^b	0,80 $\pm$ 0,75 ^b
	Extrato da Polpa					
	C -	57,00 $\pm$ 2,76	37,60 $\pm$ 2,42	3,20 $\pm$ 0,75	1,60 $\pm$ 0,80	0,60 $\pm$ 0,80
	C +	57,20 $\pm$ 1,33 ^a	37,00 $\pm$ 0,63 ^a	3,00 $\pm$ 0,89 ^a	1,60 $\pm$ 0,49 ^a	1,20 $\pm$ 0,40 ^a
	O 03	56,00 $\pm$ 3,41 ^a	40,60 $\pm$ 4,22 ^a	2,00 $\pm$ 0,63 ^a	1,00 $\pm$ 0,89 ^a	0,40 $\pm$ 0,49 ^a
	O 15	52,80 $\pm$ 2,14 ^{a*}	43,20 $\pm$ 3,31 ^{a*}	2,40 $\pm$ 0,49 ^a	1,20 $\pm$ 0,98 ^a	0,40 $\pm$ 0,49 ^a
	O 30	56,80 $\pm$ 1,17 ^a	37,60 $\pm$ 1,02 ^a	3,00 $\pm$ 0,63 ^a	2,20 $\pm$ 0,98 ^a	0,40 $\pm$ 0,49 ^a
	Pré 03	55,40 $\pm$ 1,50 ^b	40,20 $\pm$ 2,93 ^b	3,00 $\pm$ 0,89 ^b	0,80 $\pm$ 0,75 ^b	0,60 $\pm$ 0,80 ^b
	Pré 15	54,20 $\pm$ 1,94 ^{b*}	39,20 $\pm$ 1,17 ^b	3,40 $\pm$ 1,20 ^b	2,40 $\pm$ 1,02 ^b	0,80 $\pm$ 0,75 ^b
	Pré 30	55,40 $\pm$ 1,62 ^b	39,00 $\pm$ 1,79 ^b	3,00 $\pm$ 0,89 ^b	1,80 $\pm$ 0,40 ^b	0,80 $\pm$ 0,40 ^b
Sim 03	55,60 $\pm$ 2,87 ^b	39,60 $\pm$ 2,87 ^b	3,20 $\pm$ 0,75 ^b	1,40 $\pm$ 0,80 ^b	0,20 $\pm$ 0,40 ^b	

Sim 15	55,80 ± 3,19 ^b	41,00 ± 2,61 ^{b*}	2,20 ± 0,98 ^b	0,60 ± 0,80 ^b	0,40 ± 0,49 ^b
Sim 30	52,60 ± 1,74 ^{b*}	42,20 ± 1,72 ^{b*}	3,40 ± 0,80 ^b	1,40 ± 1,02 ^b	0,40 ± 0,80 ^b
Pós 03	56,80 ± 1,33 ^b	38,00 ± 1,79 ^b	3,20 ± 0,75 ^b	1,40 ± 0,80 ^b	0,60 ± 0,49 ^b
Pós 15	56,80 ± 2,23 ^b	39,00 ± 1,79 ^b	2,40 ± 0,49 ^b	1,20 ± 0,40 ^b	0,60 ± 0,80 ^b
Pós 30	52,40 ± 2,15 ^{b*}	42,00 ± 1,67 ^{b*}	3,20 ± 0,75 ^b	2,00 ± 1,26 ^b	0,40 ± 0,49 ^b

EPM: Erro Padrão da Média. Letra ^a indica grupo comparado ao Controle Negativo, letra ^b indica grupo comparado ao Controle Positivo e * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Tabela 7. Avaliação de apoptose em baço, fígado e rins de camundongos tratados com Extrato da Amêndoa e da Polpa.

Grupos Experimentais	Baço		Fígado		Rins		Baço		Fígado		Rins	
	TCA	Média ± EPM	TCA	Média ± EPM	TCA	Média ± EPM	TCA	Média ± EPM	TCA	Média ± EPM	TCA	Média ± EPM
	Extrato da Amêndoa						Extrato de Polpa					
C -	7	1,40 ± 0,49	6	1,20 ± 0,75	4	0,80 ± 0,40	7	1,40 ± 0,49	6	1,20 ± 0,75	4	0,80 ± 0,40
C +	115	23,00 ± 2,00 ^{a*}	114	22,80 ± 2,56 ^{a*}	101	20,20 ± 1,47 ^{a*}	115	23,00 ± 2,00 ^{a*}	114	22,80 ± 2,56 ^{a*}	101	20,20 ± 1,47 ^{a*}
O 3	1	0,20 ± 0,40 ^a	0	0,00 ± 0,00 ^a	1	0,20 ± 0,40 ^a	0	0,00 ± 0,00 ^a	1	0,20 ± 0,40 ^a	3	0,60 ± 0,49 ^a
O15	1	0,20 ± 0,40 ^a	1	0,20 ± 0,40 ^a	2	0,40 ± 0,49 ^a	2	0,40 ± 0,49 ^a	0	0,00 ± 0,00 ^a	3	0,60 ± 0,80 ^a
O30	2	0,40 ± 0,49 ^a	3	0,60 ± 0,80 ^a	1	0,20 ± 0,40 ^a	3	0,60 ± 0,80 ^a	3	0,60 ± 0,80 ^a	2	0,40 ± 0,49 ^a
Pré 3	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}	4	0,80 ± 1,17 ^{b*}	4	0,80 ± 1,17 ^{b*}	1	0,20 ± 0,40 ^{b*}	2	0,40 ± 0,49 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}
Pré 15	3	0,60 ± 0,49 ^{b*}	1	0,20 ± 0,40 ^{b*}	2	0,40 ± 0,49 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}	4	0,80 ± 1,17 ^{b*}	1	0,20 ± 0,40 ^{b*}
Pré 30	2	0,40 ± 0,80 ^{b*}	3	0,60 ± 0,49 ^{b*}	2	0,40 ± 0,80 ^{b*}	2	0,40 ± 0,80 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}	2	0,40 ± 0,80 ^{b*}
Sim 3	4	0,80 ± 1,17 ^{b*}	3	0,60 ± 0,49 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}	4	0,80 ± 1,17 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}
Sim 15	2	0,40 ± 0,49 ^{b*}	2	0,40 ± 0,49 ^{b*}	5	1,00 ± 0,89 ^{b*}	2	0,40 ± 0,80 ^{b*}	2	0,40 ± 0,49 ^{b*}	3	0,60 ± 1,20 ^{b*}
Sim 30	3	0,60 ± 0,49 ^{b*}	4	0,80 ± 0,40 ^{b*}	4	0,80 ± 0,75 ^{b*}	4	0,80 ± 1,17 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}
Pós 3	5	1,00 ± 0,89 ^{b*}	3	0,60 ± 0,49 ^{b*}	4	0,80 ± 0,75 ^{b*}	3	0,60 ± 0,80 ^{b*}	3	0,60 ± 0,49 ^{b*}	1	0,20 ± 0,40 ^{b*}
Pós 15	4	0,80 ± 0,75 ^{b*}	1	0,20 ± 0,40 ^{b*}	2	0,40 ± 0,80 ^{b*}	5	1,00 ± 0,63 ^{b*}	2	0,40 ± 0,80 ^{b*}	6	1,20 ± 1,47 ^{b*}
Pós 30	5	1,00 ± 1,10 ^{b*}	6	1,20 ± 1,17 ^{b*}	4	0,80 ± 0,75 ^{b*}	3	0,60 ± 0,49 ^{b*}	4	0,80 ± 1,17 ^{b*}	5	1,00 ± 0,63 ^{b*}

EPM: Erro Padrão da Média. TCA: Total de Células Apoptóticas. Letra ^a indica grupo comparado ao Controle Negativo, letra ^b indica grupo comparado ao Controle Positivo e * indica diferença estatisticamente significativa ($p < 0.05$).

Considerações Finais

A avaliação dos óleos de polpa e amêndoa de *Acrocomia aculeata* indicou que os mesmos:

- ✓ não são genotóxicos;
- ✓ não são mutagênicos;
- ✓ causaram discreto aumento nas taxas de fagocitose esplênica;
- ✓ não causaram aumento nas taxas de apoptose em baço, fígado e rins.
- ✓ produziram uma discreta diminuição na quantidade de danos ao DNA em relação aos grupos não tratados.

Quando associados ao quimioterápico ciclofosfamida, os óleos de polpa e de amêndoa:

- ✓ demonstraram possuir atividade antigenotóxica e antimutagênica e pode agir tanto por desmutagênese quanto por bioantimutagênese;
- ✓ demonstraram possuir discreta atividade imunomodulatória;
- ✓ demonstraram possuir efeito anti-apoptótico;
- ✓ demonstraram não possuir efeito potencializador do quimioterápico.

Frente o exposto, infere-se que os extratos de *A. aculeata* podem compor alimentos funcionais/nutracêuticos com características quimiopreventivas. No entanto, não são fontes adequadas para a busca de coadjuvantes quimioterápicos, em especial, para o uso combinado com a agente antitumoral ciclofosfamida porque é capaz de diminuir a eficiência mutagênica e apoptótica do mesmo.