



Universidade de Brasília

Faculdade de Saúde

Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Mariana Matos Roll

**Avaliação hematológica e do potencial genotóxico,
antigenotóxico e antioxidante do óleo e dos extratos etanólico,
hidroetanólico e aquoso da polpa do pequi (*Caryocar
brasiliense* Camb.) em camundongos Swiss**

Brasília

2013

Universidade de Brasília
Faculdade de Saúde
Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular

Mariana Matos Roll

**Avaliação hematológica e do potencial genotóxico,
antigenotóxico e antioxidante do óleo e dos extratos etanólico,
hidroetanólico e aquoso da polpa do pequi (*Caryocar
brasiliense* Camb.) em camundongos Swiss**

Dissertação apresentada ao Departamento de Pós-graduação
em Patologia Molecular da Universidade de Brasília como
requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em
Patologia Molecular

Orientador: Prof^o. Dr^o. Cesar Koppe Grisolia
Coorientadora: Prof^a Dr^a Ana Luisa Miranda-Vilela

Brasília
2013

AGRADECIMENTOS

Agradeço,

Primeiramente, à minha família, principalmente aos meus pais Fabriciano e Clarice, ao meu irmão Renato, aos meus avós Cosme e Clara e aos meus tios Cláudio e Cleber, por sempre me incentivarem a estudar e pelo apoio e compreensão quando decidi ingressar no mestrado.

Ao meu namorado Thiago e aos meus amigos pela força durante os momentos difíceis e pela paciência nos momentos em que estive ausente.

Ao Prof^o Cesar Koppe Grisólia e a Prof^a Ana Luísa Miranda-Vilela pela oportunidade e confiança em mim depositada para continuar os trabalhos do grupo com o pequi e pelo apoio durante os experimentos e o processo de redação da dissertação.

Aos colegas e amigos do Laboratório de Genética Toxicológica (GTox) Ieler Ferreira, Maria Luiza Fascineli, Paolin Rocio, Thaís Muniz, Wânia Guimarães, Lilian Barbosa, Ingrid Freire, Igor Martins, Vinícius Nathan, José Filho, Karina Mota, Ingrid Reale e Bélin Mezzomo que sempre muito queridos estavam dispostos a ajudar e a compartilhar conhecimentos.

Ao Prof^a Osmindo Rodrigues e ao Prof^o Carlos Schwartz do Laboratório de Toxinologia, ao seu Chiquinho do Laboratório de Bioquímica e ao Laboratório de Farmacognosia por liofilizar minhas amostras, passo crucial para o início do estudo.

À Prof^a Zulmira e aos colegas do Laboratório de Nanotoxicologia por disponibilizarem os equipamentos sem os quais seria impossível concluir os experimentos e, principalmente, à Flávia Portilho, a Adriana Martins e ao Cesar Romero pela grande ajuda prestada durante os experimentos com os animais.

Ao grupo do Prof^o Ricardo Bentes, especialmente à Dona Zélia Madeira e ao Prof^o João que gentilmente me auxiliaram em diversas etapas dos experimentos.

À Dr^a Tânia Agostini e aos membros do Laboratório de Análises em Alimentos da Embrapa Cerrados pela orientação e assistência na determinação de carotenoides e compostos fenólicos totais nas amostras de pequi.

À empresa Farmacotécnica pelo fornecimento do óleo do pequi, indispensável para a conclusão dos estudos com a polpa do pequi.

Aos professores que ministraram as disciplinas que cursei durante o mestrado, o conhecimento adquirido nas aulas, discussões e seminários contribuíram significativamente para a minha formação.

À banca examinadora, composta pelas professoras Laila Salmen Espindola, Zulmira Guerrero Lacava e Maria Luíza Fascineli que contribuíram enormemente para a qualidade da versão final da dissertação.

Ao CNPq pela concessão da bolsa de mestrado, que permitiu a minha dedicação exclusiva a pesquisa.

E a todos que de alguma forma me auxiliaram e colaboram para a minha formação.

"São precisamente as perguntas para as quais não existem respostas que marcam os limites das possibilidades humanas e traçam as fronteiras da nossa existência".

Milan Kundera

RESUMO

Os radicais livres são espécies reativas produzidas sob condições fisiológicas e patológicas nos organismos aeróbios, que podem causar danos às macromoléculas biológicas e participar do desenvolvimento de doenças degenerativas e do processo carcinogênico. O consumo de antioxidantes naturais, a partir da dieta ou da suplementação com nutracêuticos e fitoterápicos, tem-se mostrado eficaz contra os efeitos deletérios das espécies reativas. O pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) é um fruto típico do bioma cerrado utilizado pela população nativa para fins gastronômicos, nutricionais e medicinais. A polpa do pequi contém diversos antioxidantes naturais como as vitaminas C e E, compostos fenólicos, carotenoides e óleos essenciais que podem atuar na proteção do DNA, lipídeos e proteínas contra os danos causados por espécies reativas. Baseando-se nas características da polpa do pequi, o objetivo do estudo foi avaliar o potencial antioxidante, genotóxico, antígenotóxico e as alterações hematológicas promovidas pelo tratamento com o óleo e os extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso da polpa de pequi em camundongos Swiss de ambos os sexos. O quimioterápico doxorrubicina (DX), conhecido por seu potencial em induzir danos oxidativos, foi utilizado para verificar a capacidade protetora do óleo e dos extratos da polpa de pequi contra as lesões promovidas pelos radicais livres (RL). A caracterização fitoquímica das amostras da polpa de pequi confirmou a presença de carotenoides no óleo e no extrato etanólico e de compostos fenólicos nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso. Os resultados da determinação de macro e micronutrientes demonstraram a presença de minerais nas amostras, porém em diferentes quantidades. O óleo e os extratos apresentaram atividade antioxidante *in vitro* no ensaio DPPH, sendo a do óleo a menos eficiente entre as amostras da polpa do pequi analisadas. Entre os extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso não houve diferenças significativas em relação à atividade antioxidante *in vitro*. A atividade antioxidante *in vivo* foi analisada no plasma dos camundongos tratados pelo ensaio TBARS, porém os resultados obtidos sofreram grande interferência da hemoglobina presente no plasma devido à hemólise durante o processo de obtenção das amostras a serem analisadas. Em relação às alterações hematológicas, apenas o tratamento com o extrato aquoso nos machos induziu ao decréscimo de parâmetros do eritrograma, provavelmente devido às saponinas hemolíticas no extrato. O tratamento associado a DX promoveu alterações nos parâmetros do hemograma e do leucograma dos camundongos tratados devido à

peroxidação lipídica e degradação de membranas induzidas pela DX e incapacidade dos extratos em preveni-las. Os efeitos genotóxicos e mutagênicos dos tratamentos foram avaliados por meio do teste do cometa e do teste do micronúcleo nas células de medula óssea, respectivamente. Apenas o tratamento com o extrato etanólico foi genotóxico nas fêmeas, porém não foi mutagênico. O tratamento associado a DX foi mutagênico e citotóxico, evidenciado que óleo e os extratos não foram capazes de prevenir os efeitos tóxicos da DX na dose administrada. O possível mecanismo pelo qual as amostras da polpa de pequi foram incapazes de proteger o organismo contra os efeitos da DX, deve-se, possivelmente, ao conteúdo de metais de transição no óleo e nos extratos, principalmente o ferro, que reagem com a molécula de DX e através de reações de oxirredução formam o potente radical livre semiquinona, capaz de interagir com o DNA e outras macromoléculas biológicas.

Palavras-chave: *Caryocar brasiliense* Camb., carotenoides, compostos fenólicos, DPPH, teste do cometa, teste do micronúcleo, efeito genotóxico, efeito antígenotóxico, efeito mutagênico, antioxidante, doxorrubicina.

ABSTRACT

Free radicals are reactive species, produced under physiological and pathological conditions in aerobic organisms, which can cause damage to biological macromolecules and participate in the development of degenerative diseases and the carcinogenic process. Consumption of natural antioxidants from diet or supplementation with herbal drugs and nutraceuticals has been shown to be effective against the deleterious effects of reactive species. Pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) is a typical fruit of the Cerrado and is used by the native population for culinary, nutritional and medicinal purposes. Pequi pulp contains many natural antioxidants such as vitamins C and E, phenolic compounds, carotenoids and essential oils that can act in protecting DNA, lipids and proteins against the damage caused by reactive species. Based on pequi pulp characteristics, the aim of the study was to evaluate the antioxidant, genotoxic, antigenotoxic potential and hematological alterations promoted by oil or ethanolic, hydroethanolic and aqueous extracts of pequi pulp treatment in Swiss mice of both sexes. The chemotherapeutic doxorubicin (DX), known for its potential to induce oxidative damage, was used to verify the protective capacity of the oil and extracts against injury promoted by free radicals. Phytochemical characterization of the samples confirmed the presence of carotenoids in oil and ethanol extract and phenolic compounds in ethanolic, hydroethanolic and aqueous extracts. Determination of macro and micronutrients showed the presence of minerals in the samples, but in different quantities. Pequi pulp oil and extracts exhibited antioxidant activity in the DPPH in vitro assay, but the oil was less efficient than the extracts. Among the ethanolic, hydroethanolic and aqueous extracts there were no significant differences. The in vivo antioxidant activity was analyzed in plasma of treated mice by TBARS assay, but the results underwent significant interference of hemoglobin present in the plasma due to hemolysis during the process of obtaining the samples to be analyzed. Regarding hematological values, only the treatment with the aqueous extract in males induced a decrease in erythrocyte parameters, probably due to hemolytic saponins in the extract. The treatment associated with DX promoted changes in the parameters of the CBC and leukocyte counts of treated mice, due to lipid peroxidation and degradation of membranes induced by DX and inability of extracts to prevent them. The genotoxic and mutagenic effects of the treatments were evaluated by the comet assay and

micronucleus test in bone marrow cells, respectively. Only treatment with the ethanol extract was genotoxic in females, but was non-mutagenic. The treatment associated with DX was mutagenic and cytotoxic and showed that the pequi pulp oil and extracts were not able to prevent the toxic effects of the high dose of DX. The possible mechanism by which Pequi pulp samples were unable to protect against the effects of DX is due to the content of transition metals in oil and extracts, mainly iron, which react with the DX molecule by redox reactions that form the potent free radical semiquinone capable of interacting with DNA and other biological macromolecules.

Keywords: *Caryocar brasiliense* Camb., carotenoids, phenolic compounds, DPPH, comet assay, micronucleus test, genotoxicity, antigenotoxicity, mutagenic effect, antioxidant, doxorubicin.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1:** Estruturas do pequi: mesocarpo interno, mesocarpo externo e epicarpo. Na figura não está representado o endocarpo, que constitui a porção espinhosa que protege a semente ou amêndoa. O mesocarpo interno ou polpa reveste o endocarpo18
- Figura 2:** Pequizeiro19
- Figura 3:** Conjugação da glutathiona com o xenobiótico (X), catalisada pela enzima glutathiona S-transeferase28
- Figura 4:** Estrutura química do tocoferol e do tocotrienol.....30
- Figura 5:** Estrutura química dos carotenoides. A) Carotenoides lipofílicos, B) Xantofilas (oxicarotenoides), carotenoides com substituições que conferem maior hidrossolubilidade a molécula31
- Figura 6:** Grupos e subgrupos de compostos fenólicos33
- Figura 7:** 8-oxoguanina: lesão oxidativa promovida pela interação do radical livre OH^\cdot com a base nitrogenada guanina35
- Figura 8:** Representação do nucleóide no teste do cometa. Na cabeça do cometa se entra o DNA enovelado e na cauda os fragmentos de DNA40
- Figura 9:** Modelo esquemático de formação do micronúcleo. As sondas centroméricas (em amarelo) auxiliam na identificação do tipo de instabilidade genômica e na distinção entre os efeitos clastogênicos e aneugênicos. (A) O micronúcleo foi originado de um fragmento cromossômico acêntrico; (B) O micronúcleo foi originado da perda de um cromossomo inteiro41
- Figura 10:** Micronúcleo em eritrócito policromático corado com Giemsa. Imagem capturada em microscópio de luz com aumento 1000x.....42
- Figura 11:** Curva de calibração do ácido gálico para a determinação de compostos fenólicos totais no óleo e nos extratos da polpa de pequi.....46
- Figura 12:** Esquema ilustrativo do delineamento experimental. D: dia; DX: doxorubicina; %EPC: porcentagem de eritrócitos policromáticos.....50
- Figura 13:** Aduto formado através reação de adição nucleofílica entre o malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (ATB), em meio ácido submetido ao calor53
- Figura 14:** Massa corporal dos camundongos fêmeas e machos, antes e após o tratamento com o óleo ou extratos da polpa do pequi ou com a associação óleo ou extratos + doxorubicina.....58
- Figura 15:** Porcentagem de eritrócitos policromáticos (%EPC) de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 mg/animal/dia) administrados

oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorubicina (DX) intraperitoneal, 48 horas antes da eutanásia A) fêmeas e B) machos.....72

Figura 16: Resultados do Teste do Cometa de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 mg/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorubicina (DX) intraperitoneal, 48 horas antes da eutanásia A) fêmeas e B) machos.....74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Composição de ácidos graxos da polpa e da amêndoa do pequi	20
Tabela 2: Composição de carotenoides na polpa do pequi.....	21
Tabela 3: Ácidos fenólicos identificados na polpa e na amêndoa do pequi.....	21
Tabela 4: Composição de minerais na polpa do pequi.....	22
Tabela 5: Grupos experimentais (n=5 por grupo) e os respectivos tratamentos.....	49
Tabela 6: Teor de carotenoides totais e compostos fenólicos totais no óleo e nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso da polpa de pequi.....	55
Tabela 7: Determinação de minerais no óleo e nos extratos etanólicos, hidroetanólico e aquoso da polpa de pequi	56
Tabela 8: Capacidade antioxidante do óleo e dos extratos da polpa de pequi e dos controles BHT e vitamina C, utilizando-se o teste de DPPH	56
Tabela 9: Resultados do teste de Tbars em camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 mg/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg de doxorubicina (DX) intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia.....	60
Tabela 10: Resultados do eritrograma de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 mg/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg de doxorubicina (DX) intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia.....	63
Tabela 11: Resultados do leucograma de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 mg/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorubicina (DX) intraperitoneal, 48 horas antes da eutanásia.....	68
Tabela 12: Resultados do plaquetograma de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 mg/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorubicina (DX) intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia.....	69
Tabela 13: Resultados do teste do micronúcleo em camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 mg/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada	

administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorrubicina (DX)
intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia.....70

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

$^1\text{O}_2$	oxigênio singleto
AQ	extrato aquoso
BHT	hidróxido toluene butilado
CEUA	Comitê de Ética no uso de Animais
CHCM	concentração hemoglobínica corpuscular média
CN	controle negativo
CP	controle positivo
DPPH	2,2-difenil-1-picril-hidrazila
DX	doxorrubicina
EC ₅₀	concentração mínima capaz de inibir 50% do radical livre
ENC	eritrócitos normocromáticos
EPC	eritrócitos policromáticos
ERN	espécies reativa de nitrogênio
ERO	espécie reativa de oxigênio
ET	extrato etanólico
Fe ²⁺	íon ferroso
Fe ³⁺	íon ferríco
GPX	glutathione peroxidase
GSH	glutathione
GSSG	glutathione dissulfeto
GST	glutathione-S-transferase
H ₂ O ₂	peróxido de hidrogênio
HCM	hemoglobina corpuscular média
HCT	hematócito
HE	extrato hidroetanólico
HGB	hemoglobina
LDL	lipoproteína de baixa densidade
MDA	malonaldeído
MN-ENC	micronúcleo em eritrócito normocromáticos
MN-EPC	micronúcleo em eritrócitos policromáticos
NO	óxido nítrico

OH•	radical hidroxila
OP	óleo da polpa do pequi
PDW	amplitude da distribuição das plaquetas
P-LCR	porcentagem de plaquetas gigantes
PUFA	ácidos graxos poliinsaturados
RDW	amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos
SBF	soro bovino fetal
SNC	sistema nervoso central
SOD	superóxido dismutase
TBA	ácido tiobarbitúrico
TBARS	Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico
UV	ultravioleta
VCM	volume corpuscular médio
VPM	volume plaquetário médio

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Caryocar Brasiliense Camb	17
1.1.1. Caracterização botânica	17
1.1.2. Caracterização química	19
1.1.3. Aspectos terapêuticos nutricionais e econômicos	22
1.2. Radicais Livres e estresse oxidativo	23
1.2.1. Defesas antioxidantes.....	26
1.2.1.1. Antioxidantes enzimáticos.....	26
1.2.1.2. Antioxidantes não enzimáticos.....	28
1.2.1.2.1. Antioxidantes de origem vegetal.....	29
1.2.2. Danos às macromoléculas biológicas.....	34
1.2.3. Desordens associadas ao estresse oxidativo.....	36
1.3. Antineoplásicos e o estresse oxidativo.....	38
1.4. Ensaio de mutagênese e genotoxicidade.....	38
1.4.1. Teste do Cometa.....	39
1.4.2. Teste do Micronúcleo.....	40
2. OBJETIVO.....	43
2.1. Geral.....	43
2.2. Específicos.....	43
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	44
3.1. Obtenção do óleo e dos extratos da polpa do pequi.....	44
3.2. Caracterização fitoquímica.....	45
3.2.1. Carotenoides totais.....	45
3.2.2. Composto fenólicos totais.....	45
3.2.3. Quantificação de minerais.....	46
3.3. Avaliação da atividade antioxidante in vitro.....	46
3.3.1. Teste do DPPH.....	46
3.4. Ensaio biológicos.....	48
3.4.1. Animais.....	48
3.4.2. Desenho experimental.....	48

3.4.3. Coleta do sangue e medula óssea.....	49
3.4.4. Avaliação hematológica.....	50
3.4.5. Teste do Cometa.....	50
3.4.6. Teste do micronúcleo e citotoxicidade.....	51
3.4.7. Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (Tbars).....	52
3.4.8. Análises estatísticas.....	53
4. RESULTADOS.....	55
4.1. Caracterização fitoquímica.....	55
4.2. Capacidade antioxidante in vitro.....	56
4.3. Ensaio biológico.....	57
4.3.1. Massa corporal antes e após o tratamento.....	57
4.3.2. Teste Tbars.....	59
4.3.3. Avaliação hematológica.....	61
4.3.3.1. Eritrograma.....	61
4.3.3.2. Leucograma.....	66
4.3.3.3. Plaquetograma.....	68
4.3.4. Teste do micronúcleo e índice de proliferação celular (%EPC).....	70
4.3.5. Teste do Cometa.....	73
5. DISCUSSÃO.....	76
5.1. Características fitoquímicas do óleo e dos extratos da polpa de pequi.....	76
5.2. Ensaio biológico.....	79
6. CONCLUSÕES.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	86
ANEXO.....	97

1. INTRODUÇÃO

1.1. *Caryocar brasiliense* (Camb.)

Caryocar brasiliense é uma espécie vegetal típica da região do cerrado brasileiro, conhecida popularmente por pequizeiro e seu fruto por pequi ou piqui. O pequizeiro detém um valor econômico significativo para as comunidades locais, sobretudo nas regiões Centro-Oeste e Sudoeste do Brasil. A importância da espécie para as regiões nativas se deve, principalmente, aos seus aspectos nutricionais, gastronômicos e comerciais (ALMEIDA e SILVA, 1994).

No Brasil existem diversas espécies de pequizeiros, porém no cerrado do Planalto Central a espécie prevalente é a *Caryocar brasiliense* Camb. O gênero *Caryocar* pertence à família Caryocaceae e engloba 16 espécies, sendo 12 encontradas no território brasileiro. Em muitas regiões, as várias espécies do gênero *Caryocar* são igualmente denominadas pequi ou pequiá, acontecimento que gera confusões entre as espécies (OLIVEIRA e GUERRA, 2008).

O pequizeiro é considerado a árvore símbolo do cerrado devido à dispersão em todas as regiões do país das suas diversas espécies e a elevada ocorrência no bioma (NAVES, 1999; OLIVEIRA e GUERRA, 2008). O cerrado corresponde ao segundo maior bioma brasileiro com aproximadamente 2 milhões km², ocupando aproximadamente 22% do território nacional. Com mais de 7000 espécies vegetais, o cerrado é considerado a savana tropical mais valiosa do mundo. Apesar da riqueza e biodiversidade de sua flora e fauna, o cerrado sofre com a crescente transformação do meio para a formação de terrenos propícios à pecuária e a agricultura (KLINK e MACHADO, 2005; ARAÚJO, 1995), fato que desperta a atenção da comunidade e das autoridades competentes para a importância da preservação do cerrado, por meio da elaboração de planos e políticas para incentivar o manejo sustentável da coleta do pequi, sem alterações drásticas e destruição do bioma (RIBEIRO e WALTER, 2008).

1.1.1. Caracterização botânica

O pequi é uma drupa esférica que apresenta, frequentemente, de um a quatro segmentos ou caroços. O pericarpo é bastante delgado com coloração esverdeada ou marrom-esverdeada, correspondente à menor porção do fruto (ASCARI et al., 2010;

LIMA et al., 2007). O mesocarpo externo é uma camada esbranquiçada bastante espessa, enquanto o mesocarpo interno ou polpa é caracterizado por ser a parte comestível do fruto, sendo uma massa amarela, farinácea, pastosa e oleosa que reveste o endocarpo e corresponde, em média, a 8,5% da massa total do fruto (ASCARI et al., 2010; RAMOS et al., 2001; VERA et al., 2005). O mesocarpo interno está intimamente aderido ao endocarpo, constituindo um único segmento (Figura 1).

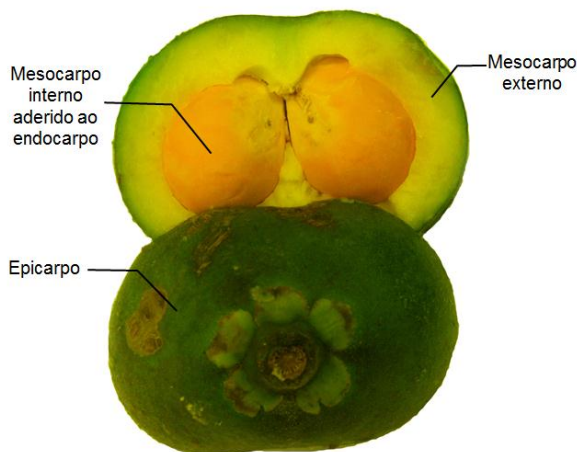


Figura 1. Estruturas do pequi: mesocarpo interno, mesocarpo externo e epicarpo. Na figura não está representado o endocarpo, que constitui a porção espinhosa que protege a semente ou amêndoa. O mesocarpo interno ou polpa reveste o endocarpo.

A semente do pequi encontra-se protegida por um endocarpo lenhoso, recoberto com alta densidade de espinhos delgados e avermelhados – característica responsável pela denominação do fruto. Em tupi (língua dos indígenas nativos do Brasil), a palavra “pyqui” significa: “py” = casca e “qui” = espinhos, ou seja, fruto recoberto de espinhos (ALMEIDA e SILVA, 1994; ARAÚJO, 1995).

O pequizeiro apresenta um porte arbóreo, atingindo entre 8 e 12 metros de altura (OLIVEIRA e GUERRA, 2008) (figura 2). A renovação das folhas e flores do pequizeiro ocorre durante estiagem; no entanto os frutos amadurecem durante o período chuvoso, três a quatro meses após o florescimento. Os primeiros frutos aparecem no mês de novembro, porém o pico é durante os meses de dezembro e janeiro, podendo ser encontrados até fevereiro (ALMEIDA et al., 1998; LORENZI, 2002).



Figura 2: Pequizeiro (fonte: <http://faunafloraextincao.blogspot.com.br/2011/02/pequizeiro.html>)

1.1.2. Caracterização química

O mesocarpo interno ou polpa, porção do fruto mais consumida pela população, apresenta um alto teor de lipídios totais: 33,4%. Além disso, representa uma importante fonte de fibras alimentares (10,02%) e proteínas (3%), com a capacidade energética de 358 kcal/100g. Na amêndoa ou semente a proporção de lipídios e proteínas é mais elevada, 51,51% e 25,27% respectivamente; contendo também carboidratos (8,33%) e fibras alimentares (2,2%) (LIMA et al., 2007).

Os ácidos graxos insaturados representam a maior proporção de lipídios encontrados na polpa e na amêndoa do pequi (58 a 61,35%) (MIRANDA-VILELA et al., 2009a). Os principais ácidos graxos são o ácido oleico e o ácido palmítico. Na polpa o ácido oleico encontra-se na maior proporção, 53,9 a 55,87%, seguido pelo ácido palmítico, 35,17 a 41,78%. Na amêndoa a proporção desses ácidos graxos é similar, sendo de ácido oleico 43,76% e de ácido palmítico 43,56%. Outros ácidos graxos também são encontrados em menor proporção (Tabela 1) (FACIOLI e GONÇALVES, 1998; LIMA et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al., 2009a).

Tabela 1: Composição de ácidos graxos da polpa e da amêndoa do pequi.

Ácidos graxos	Polpa (%)			Amêndoa (%)
	Facioli e Gonçalves, 1998	Lima et al., 2007	Miranda-Vilela et al., 2009	
Oléico	53,9	55,87	54,28	43,59
Palmítico	40,2	35,17	41,78	43,76
Esteárico	2,3	2,25	1,28	2,54
Cis-vacênico	-	1,90	-	1,38
Linoléico	1,5	1,53	1,36	5,51
Palmitoléico	1,4	1,03	0,67	1,23
α-linolênico	0,7	0,45	0,51	0,09
Gadoléico	-	0,27	-	0,04
Araquídico	0,2	0,23	0,12	0,20
Mirístico	-	0,13	-	0,46
Láurico	-	0,04	-	-
Docosaexaenóico	-	-	-	0,19
Total de saturados	-	37,97	40-42%	47,17
Total de insaturados	-	61,35	58-60%	52,48

A elevada proporção de lipídios que compõe o pequi e a intensa incidência de radiação solar na região do cerrado brasileiro favorece a formação de radicais livres e a lipoperoxidação. Para tanto, o pequizeiro necessita de meios para inibir a degradação dos lipídios presentes no fruto, sobretudo na polpa. Os metabólitos secundários das plantas, principalmente os compostos fenólicos e os carotenoides apresentam papel crucial na prevenção do estresse oxidativo no pequizeiro (LIMA, 2008).

O valor médio de carotenoides encontrados na polpa crua é de 231,09 $\mu\text{g}/\text{mg}$. Os tipos de carotenoides e suas respectivas porcentagens na polpa, de acordo com Ramos et al. (2001) estão apresentados na tabela 2. Azevedo-Meleiro e Rodriguez-Amaya (2004) determinaram que os principais carotenoides encontrados na polpa são violanxantina, luteína e zeaxantina; em menores quantidades β -criptoxantina, β -caroteno e neoxantina. O estudo realizado por Lima et al. (2007) revelou que a concentração de carotenoides na polpa é de 7,5 mg/100 g, enquanto na amêndoa é consideravelmente menor: 0,295 mg/100 g.

Tabela 2: Composição de carotenoides na polpa do pequi.

Carotenoides	Teor (%)
Anteraxantina	40,54
Zeaxantina	34,24
Criptoflavina	7,70
β-caroteno	6,35
β-criptoxantina	5,25
ζ-caroteno	4,05
Mutatoxantina	1,87

FONTE: Ramos et al., 2001.

O teor de compostos fenólicos totais na polpa é de 209 mg/100 g, proporção mais elevada do que as encontradas na maioria das frutas consumidas no Brasil. Na amêndoa o teor de compostos fenólicos totais é de 122 mg/100 g (LIMA et al., 2007). Na tabela 3, constam os ácidos fenólicos identificados na polpa e na amêndoa do pequi por Lima (2008). Os principais compostos fenólicos encontrados no epicarpo são o ácido p-hidrobencóico, o ácido gálico, o ácido quínico, a quercetina e a quercetina 3-O-arabinose (ROESLER et al., 2008).

Tabela 3: Ácidos fenólicos identificados na polpa e na amêndoa do pequi.

Ácido fenólicos	Polpa ($\mu\text{g/g}$)	Amêndoa ($\mu\text{g/g}$)
Ácido Elágico	136,7	39,63
Ácido p-cumárico	34,71	32,58
Ácido gálico	13,81	9,56
Ácido p-hidrobencóico	0,56	0,68

Fonte: Lima, 2008.

Na dieta, a forma mais consumida pela população é a polpa do pequi cozida. A composição de polpa após o cozimento é variável, pois alguns compostos podem sofrer degradação quando expostos a temperaturas elevadas. No entanto, mesmo após o processo de cozimento ou infusão da polpa é possível detectar níveis consideráveis de fibras ($9,9 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), lipídios ($33 \text{ g} \cdot 100\text{g}^{-1}$), carotenoides ($8,11 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), vitamina C ($14,33 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$), vitamina A ($514,38 \text{ RAE} \cdot 100\text{g}^{-1}$), folatos ($5,1 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) e vitamina E ($110,52 \mu\text{g} \cdot 100\text{g}^{-1}$) (CARDOSO et al., 2013). Após o cozimento ocorre uma perda média de 30,25% (de 231,09 $\mu\text{g/g}$ para 154,06) de carotenoides e 12,11% de vitamina A ($375 \text{ ER} \cdot 100^{-1}\text{g}$) (RAMOS et al., 2001).

A composição química do pequizeiro e do fruto pode variar de acordo com época e local de coleta, assim como os métodos de detecção empregados. Mariano-da-Silva et. al (2009) caracterizaram o conteúdo de minerais na polpa do pequi em diversas

regiões do Goiás e verificaram que existe uma discrepância na concentração dos minerais, porém não variam significativamente. A tabela 4 indica os macro e microelementos encontrados na polpa do pequi e suas concentrações.

Tabela 4. Composição de minerais na polpa do pequi.

Mineral	Concentração
N	11,02 – 12,08 g.kg ⁻¹
P	1,08 – 2,06 g.kg ⁻¹
K	5,06 – 6,00 g.kg ⁻¹
Ca	1,34 – 2,01 g.kg ⁻¹
Mg	1,48 – 1,97 g.kg ⁻¹
S	0,57 – 0,93 g.kg ⁻¹
B	2,74 – 3,49 mg.kg ⁻¹
Cu	7,90 – 11,04 mg.kg ⁻¹
Fe	15,13 – 18,06 mg.kg ⁻¹
Mn	11,37 – 16,00 mg.kg ⁻¹
Zn	21,76 – 27,03 mg.kg ⁻¹

Fonte: Mariano-da-Silva, 2009.

1.1.3. Aspectos terapêuticos, nutricionais e econômicos

O pequizeiro como um todo apresenta grande importância para a região nativa, porém o fruto é responsável pela maior parcela da significância da espécie para a economia local.

A polpa e as sementes (amêndoas) são ricas em óleos que são utilizados para diversos fins. O óleo extraído é excelente para cozinhar, podendo inclusive substituir a manteiga de origem animal. As características organolépticas e o teor de vitaminas, óleos e proteínas confere grande interesse nutricional e gastronômico ao fruto. Nas regiões do cerrado brasileiro diversas iguarias culinárias preparadas com o pequi são apreciadas pela população, entre elas: arroz, galinhada, feijão e cuzcuz com pequi, além de licores e doces produzidos a partir da fruta (ARAÚJO, 1995; ALMEIDA et al., 1998; RAMOS et al., 2001). A amêndoa isolada pode ser utilizada para a preparação de farofas, doces e paçocas; podendo ser consumida sem processamento, como petisco (LIMA et al., 2007).

O teor de óleos e compostos antioxidantes da amêndoa, da polpa e das flores do pequi tornam essas partes da planta interessantes para o uso nas indústrias farmacêuticas e de cosméticos. O óleo extraído das sementes apresenta um odor suave e textura

agradável, sendo principalmente utilizado na produção de sabonetes e emulsões com finalidades estéticas, como cremes e loções (ARAÚJO, 1995).

O uso do pequi na medicina popular é bastante amplo, sendo empregado no tratamento de diversos tipos de moléstias. Além do efeito tonificante, antioxidante e antifúngico; o óleo da polpa é usado no tratamento de bronquites, gripes e resfriados. O chá das folhas é conhecido popularmente por regular o fluxo menstrual e na terapia adjuvante de doenças respiratórias (ROESLER et al., 2007; ASCARI et al., 2010). Os óleos obtidos dos frutos e das sementes podem ser utilizados também para lubrificação em geral e para a iluminação. A madeira é viável para construção, como combustível e para a produção de carvão vegetal. Devido à sua alta resistência mecânica e durabilidade, a madeira do pequizeiro é utilizada na composição de máquinas constituídas de peças de madeira (ARAÚJO, 1995).

1.2. Radicais Livres e Estresse Oxidativo

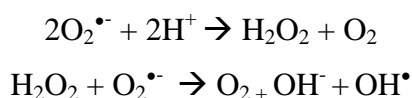
Os radicais livres são espécies químicas que apresentam elétrons desemparelhados na camada de valência, tornando-as instáveis e muito reativos (FANG et al., 2002; VALKO et al., 2006). As espécies reativas de oxigênio (ERO) e as espécies reativas de nitrogênio (ERN) – moléculas que apresentam o elétron não-pareado centrado no átomo de oxigênio ou de nitrogênio, respectivamente – são produzidas sob condições fisiológicas e patológicas e podem ser ou não espécies radicalares. As principais reações e fontes de espécies reativas são (FANG et al., 2002; HERMES-LIMA, 2004; VALKO et al., 2006;):

- irradiação pela luz ultravioleta (UV), raios X e raios gama;
- produtos de reações enzimáticas catalisadas por metais;
- poluentes ambientais;
- produção por neutrófilos e macrófagos no processo inflamatório;
- subprodutos do transporte de elétrons na mitocôndria.

A maior parte das ERO é originada como subproduto do metabolismo aeróbio na mitocôndria (JENSEN, 2003). Nos organismos aeróbios o consumo de oxigênio molecular obtido da atmosfera é vital; porém as espécies reativas produzidas na célula a partir do O₂, se não forem devidamente eliminadas, podem comprometer a integridade das biomoléculas (CERQUEIRA et al., 2007). Um exemplo de ERO é o ânion

superóxido ($O_2^{\bullet-}$), radical produzido na membrana interna da mitocôndria como subproduto da reação que reduz O_2 em H_2O (JENSEN, 2003).

Além das interações diretas do ânion superóxido com macromoléculas biológicas, ele pode interagir com outros íons ou moléculas gerando diferentes espécies reativas, como o radical hidroxila (OH^{\bullet}), o íon hidroxila (OH^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). O OH^{\bullet} é produzido por outras cascatas de reações, sendo considerada a espécie reativa mais potente, responsável por mais da metade dos danos causados por radicais livres no organismo (JENSEN, 2003; HERMES-LIMA, 2004).

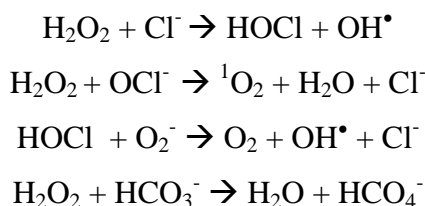


O H_2O_2 apesar de não ser uma espécie radicalar é uma molécula oxidante. A principal fonte desse composto é a desaminação oxidativa de aminas biogênicas, reação catalisada pela monoamina oxidase presente na membrana mitocondrial externa. A presença de metais de transição no organismo, como o íon ferroso (Fe^{2+}) na metaloproteína hemoglobina, pode produzir OH^{\bullet} através da interação com o H_2O_2 , conhecida como Reação de Fenton (JENSEN, 2003; HERMES-LIMA, 2004).

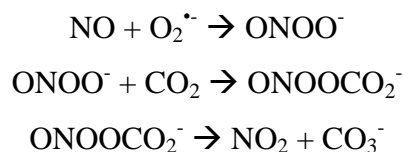


Os efeitos do H_2O_2 podem ser observados em processos celulares como fosforilação de proteínas, transcrição e apoptose, visto que tal composto atua como um mensageiro intracelular (MATÉS, 2000).

A oxidação do íon cloreto (Cl^-) pelo H_2O_2 , reação catalisada pela enzima mieloperoxidase, resulta na formação da ERO ácido hipocloroso, produto que pode levar à formação de oxigênio singleto (1O_2) ou OH^{\bullet} . Outra reação desencadeada pelo H_2O_2 é a oxidação do íon carbonato de hidrogênio a peroxicarbonato.



As espécies reativas de nitrogênio (ERN) são produzidas pela enzima óxido nítrico sintetase nas células do tecido vascular endotelial (JENSEN, 2003) e pela oxidação de um dos átomos nitrogênio guanido-terminal do aminoácido L-arginina (DRÖGE, 2002). A principal reação do óxido nítrico (NO) é com o ERO $O_2^{\bullet-}$ produzindo o peroxinitrito (ONOO⁻). Por sua vez, esse produto pode reagir com dióxido de carbono (CO₂) para formar o nitrosoperoxicarbonato (ONOOCO₂⁻) que se dissocia rapidamente nos radicais dióxido de nitrogênio (NO₂) e trióxido de carbono (CO₃⁻) (JENSEN, 2003).



Após a exposição a espécies reativas, o organismo desenvolve mecanismos com o propósito de se defender dos danos oxidativos, processo denominado sinalização redox. No entanto, quando ocorre um desequilíbrio entre a produção e eliminação dos agentes oxidantes devido ao excesso de oxidantes gerados e/ou a deficiência no sistema antioxidante protetor, a homeostase pode ser comprometida resultando no estresse oxidativo (FERREIRA e MATSUBARA, 1997; DRÖGE, 2002). O estresse oxidativo é uma condição na qual as defesas antioxidantes são insuficientes para manter os níveis de espécies reativas abaixo do limite tóxico, resultando no comprometimento das macromoléculas biológicas através da oxidação de ácidos nucleicos, proteínas, aminoácidos e lipídios, promovendo citotoxicidade, mutagênese e/ou carcinogênese e até mesmo a morte celular (MATÉS, 2000; COLLINS, 2009).

Apesar do excesso de radicais livres ser potencialmente prejudicial às estruturas celulares como DNA, proteínas e lipídios, em concentrações fisiológicas, participam da homeostase e desempenham funções na defesa do organismo contra agentes infecciosos e no sistema de sinalização celular (VALKO et al., 2006).

As espécies reativas de oxigênio exercem papel essencial na célula, atuando principalmente na transdução de sinais, na transcrição gênica e na regulação da atividade da guanilato ciclase solúvel. O NO, produzido pelas células endoteliais, é de extrema importância no relaxamento e na proliferação das células do tecido muscular vascular, na adesão de leucócitos, na agregação plaquetária, na angiogênese, na

trombose, no tônus vascular e, conseqüentemente, na hemodinâmica (FANG et al., 2002).

1.2.1. Defesas antioxidantes

Os antioxidantes são substâncias capazes de competir com outros substratos oxidáveis – ex.: macromoléculas biológicas – sendo capazes de reduzir ou inibir significativamente a oxidação desses substratos (DRÖGE, 2002). Eles podem atuar direta ou indiretamente para proteger as células dos danos oxidativos promovidos por xenobióticos, medicamentos e carcinogênicos (MATÉS, 2000).

1.2.1.1. Antioxidantes enzimáticos

As enzimas antioxidantes superóxido dismutase, catalase, glutaciona peroxidase e as glutaciona-S-transferases são essenciais na defesa do organismo contra o estresse oxidativo. Para tanto, é crucial a regulação dos níveis ideais dessas enzimas, pois são imprescindíveis para a sobrevivência da célula (LESGARDS et al., 2011).

Superóxido dismutase (SOD)

Nos humanos existem três formas de SOD: a Cu/Zn-SOD citosólica, dinuclear com os metais Cobre (Cu) e Zinco (Zn) como cofatores; a Mn-SOD mitocondrial, tendo o magnésio como cofator, e a SOD extracelular (MATÉS, 2000).

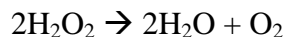
A SOD elimina os radicais superóxidos, gerados constantemente pela respiração aeróbia, convertendo-os em oxigênio molecular (O₂) e H₂O₂ para posterior eliminação pelas enzimas catalase ou glutaciona peroxidase (HERMES-LIMA, 2004).



Catalase

Enzima tetramérica, constituída de um grupo heme (ferriprotoporfirina) e uma molécula de NADPH por subunidade (MATÉS, 2000; HERMES-LIMA, 2004). A catalase reage com H₂O₂ para formar água e oxigênio molecular de forma bastante

eficiente, pois independente da concentração de H_2O_2 , a enzima não é saturada pelo substrato (MATÉS, 2000). Está presente em todos os tecidos de animais vertebrados, porém é mais ativa nos eritrócitos, no fígado, nos rins e no tecido adiposo (HERMES-LIMA, 2004).



Glutathione peroxidase (GPX)

Pertencente ao grupo das peroxidases, a GPX é uma enzima dependente do ametal selênio que catalisa a redução de diversos hidroperóxidos, através da conjugação do tripeptídeo glutathione (GSH) com o xenobiótico (MATÉS, 2000; HERMES-LIMA, 2004).



Para atuar como co-substrato da reação catalisada pela GPX, a GSH deve se apresentar reduzida. Após a transferência de elétrons decorrente da reação enzimática, a GSH forma uma ponte dissulfeto com outra molécula de GSH, formando a glutathione oxidada ou glutathione dissulfeto (GSSG). A enzima glutathione reductase catalisa a conversão de GSSG a GSH, utilizando o poder de redução do NADPH, para que o co-substrato possa ser novamente utilizado pela GPX (HERMES-LIMA, 2004).



Nos mamíferos, existe pelo menos cinco isoenzimas da GPX. A GPX1 é predominante nos eritrócitos, nos rins e no fígado. A GPX2, citosólica, é encontrada em maior concentração no trato gastrintestinal, enquanto a GPX3, extracelular, é detectada principalmente nos rins. A GPX4 é altamente expressa nas células epiteliais tubulares ou renais e nos testículos (MATÉS, 2000).

Glutathione-S-transferase (GST)

As glutathione S-transferases (GSTs) são uma família de enzimas de detoxificação de fase II que protegem as macromoléculas celulares contra o ataque de

eletrófilos reativos, endógenos e exógenos (STRANGE et al, 2001). As glutathionas-S-transferases catalisam a conjugação da GSH com xenobióticos, incluindo aldeídos produzidos durante a peroxidação lipídica (HERMES-LIMA, 2004). A conjugação com a glutathiona é o primeiro passo da via do ácido mercaptúrico envolvido na eliminação de substâncias tóxicas (TOWNSEND e TEW, 2003) (figura 3).

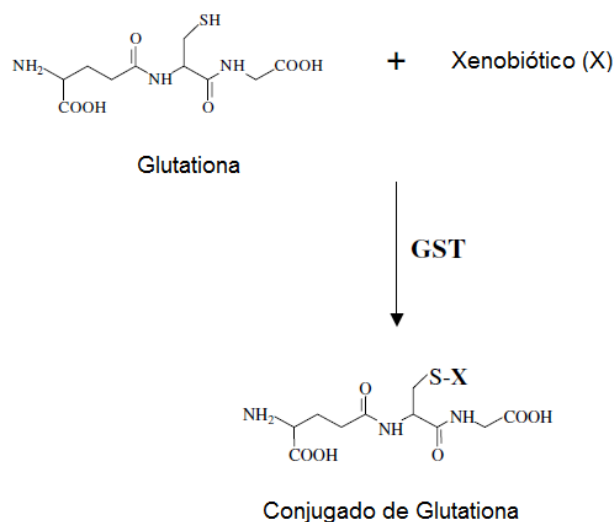


Figura 3: Conjugação da glutathiona com o xenobiótico (X), catalisada pela enzima glutathiona S-transferase (Adaptado de: Townsend e Tew, 2003).

As GSTs são divididas em duas grandes famílias: as enzimas de ligação à membrana microsomal e as enzimas citosólicas. As GSTs citosólicas são sujeitas a polimorfismos genéticos na população humana e são divididas em seis classes designadas pelas letras gregas $\alpha, \mu, \pi, \omega, \theta$ e ζ . Essas enzimas possuem propriedades consistentes com especificidades promíscuas para substratos, orientadas para atuar em grupos funcionais de substâncias ao invés de compostos específicos. Em geral, os substratos são hidrofóbicos e contém uma molécula de carbono no centro eletrofílico; no entanto, alguns substratos podem conter átomos de nitrogênio, oxigênio ou enxofre (TOWNSEND e TEW, 2003).

1.2.1.2. Antioxidantes não-enzimáticos

A maioria dos antioxidantes não-enzimáticos não são sintetizados pelo organismo de animais, tornando-se necessário o provimento desses antioxidantes por

meio da dieta. No entanto, diversos metabólitos de baixo peso molecular com ação antioxidante são produzidos pelo organismo (HERMES-LIMA, 2004).

Os principais antioxidantes não-enzimáticos endógenos são: a glutathiona e seus derivados, a melanina, produzida através da oxidação e polimerização da tirosina, que protege a pele contra a radiação UV, a melatonina, a bilirrubina e o ácido úrico (HERMES-LIMA, 2004; BAGNATI et al., 1999). Estudos indicam que o ácido úrico é um dos antioxidantes plasmáticos mais potentes, capaz de inibir a oxidação de lipídios circulantes (BAGNATI et al., 1999).

1.2.1.2.1. Antioxidantes de origem vegetal

Vitamina C

A vitamina C ou ácido ascórbico é um potente agente redutor, capaz de interagir com diversos ERO e ERN, inclusive com espécies reativas intermediárias da lipoperoxidação (CERQUEIRA et al., 2007).

Em pH fisiológico (7,4), a vitamina C ($AsCH_2$) se encontra, praticamente na sua totalidade, na forma de ascorbato (Asc^-). O ascorbato atua como antioxidante ao doar um H^\bullet ou $H^+ + e^-$ para o radical (VASCONCELOS et al., 2007). A vitamina C protege os componentes hidrossolúveis devido à sua característica hidrofílica, porém atua na reciclagem da vitamina E que interage com compostos lipofílicos (CHOI et al., 2004). Os produtos de oxidação do ascorbato são o radical ascorbila e o ânion semidesidroascorbato. O radical ascorbila, apesar de apresentar um elétron desemparelhado, é praticamente não reativo. Tal característica confere à vitamina C a capacidade de eliminar radicais extremamente reativos e deletérios, formando um radical de baixa reatividade (CERQUEIRA et al., 2007).

Vitamina E

Os tocoferóis ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$ tocoferol) e os tocotrienóis ($\alpha, \beta, \delta, \gamma$ tocotrienol) são genericamente denominados vitamina E (Figura 4). São moléculas constituídas de um núcleo cromanol com uma cadeia alifática e apresentam potencial antioxidante. Apesar da similaridade estrutural e capacidade antioxidante inerente aos compostos, o α -tocopherol é o mais potente entre eles (CERQUEIRA et al., 2007).

O α -tocoferol é capaz de inibir a reação em cadeia da lipoperoxidação prevenindo, inclusive, a oxidação de lipoproteínas de baixa densidade (LDL). O mecanismo de ação proposto é a reação do α -tocoferol com o radical alquilperoxila (ROO^\bullet), formado durante a oxidação dos ácidos graxos poliinsaturados (PUFA); portanto, o α -tocoferol evita a progressão da peroxidação (CERQUEIRA et al., 2007).

Apesar do potencial antioxidante do α -tocoferol e de sua habilidade de inibir a peroxidação lipídica, estudos indicam que em algumas situações ele pode agir como pró-oxidante, casos nos quais as concentrações de outros antioxidantes não são suficientes para reduzir o radical α -tocoferila, formado a partir da reação de eliminação de espécies reativas, a α -tocoferol (CERQUEIRA et al., 2007).

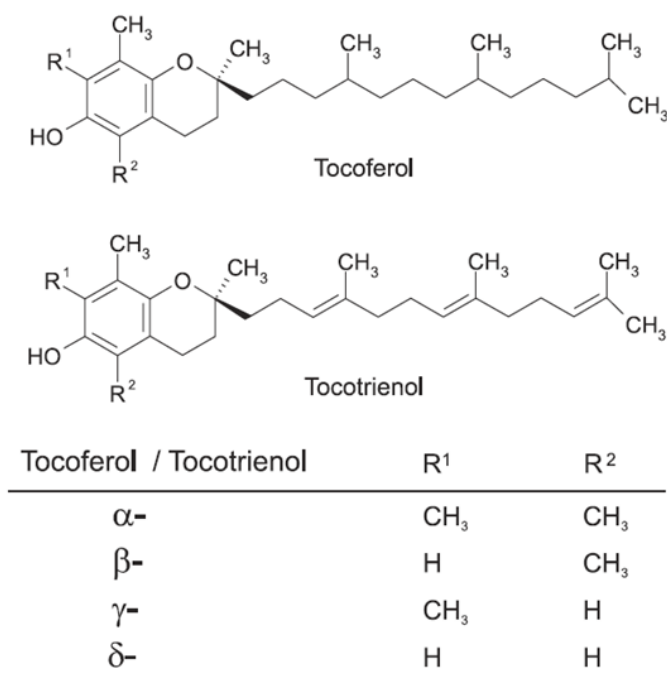


Figura 4: Estrutura química do tocoferol e do tocotrienol (Fonte: CERQUEIRA et al., 2007).

Carotenoides

Os carotenoides são compostos sintetizados por plantas, bactérias, fungos e algas, compreendendo mais de 600 moléculas até o momento conhecidas (SANDMANN, 2001). Apesar da amplitude de espécies, inclusive de diferentes reinos, capazes de sintetizá-los, a via biossintética dos carotenoides ocorre somente em plantas e microorganismos fotossintéticos (WOOLLARD, 2012).

A biossíntese dos carotenoides ocorre a partir do isopreno, composto intermediário essencial para as plantas que participa da síntese de outros metabólitos vegetais como os tocoferóis (vitamina E), os esteróis, as filoquinonas (vitamina K) e os terpenoides (WOOLLARD, 2012). Devido à origem biossintética, os carotenoides podem ser classificados como terpenos, mais precisamente tetraterpenos (YÚFERA, 1995).

A estrutura química dos carotenoides é constituída de cadeias de polienos, em geral com 40 átomos de carbonos. As longas cadeias de ligações simples e duplas alternadas formam um sistema conjugado na qual os elétrons π são deslocalizados por toda a cadeia. Essa característica confere aos carotenoides forma molecular, reatividade química e capacidade de absorver a luz (DUTTA et al., 2005).

Os carotenoides são classificados em carotenos e xantofilas. Os carotenos são essencialmente hidrocarbonetos e, portanto, bastante lipofílicos. As xantofilas são carotenoides que apresentam átomos de oxigênio na molécula, fato que confere características mais hidrofílicas a esses compostos (WOOLLARD, 2012). A figura 5 ilustra os principais carotenos e xantofilas.

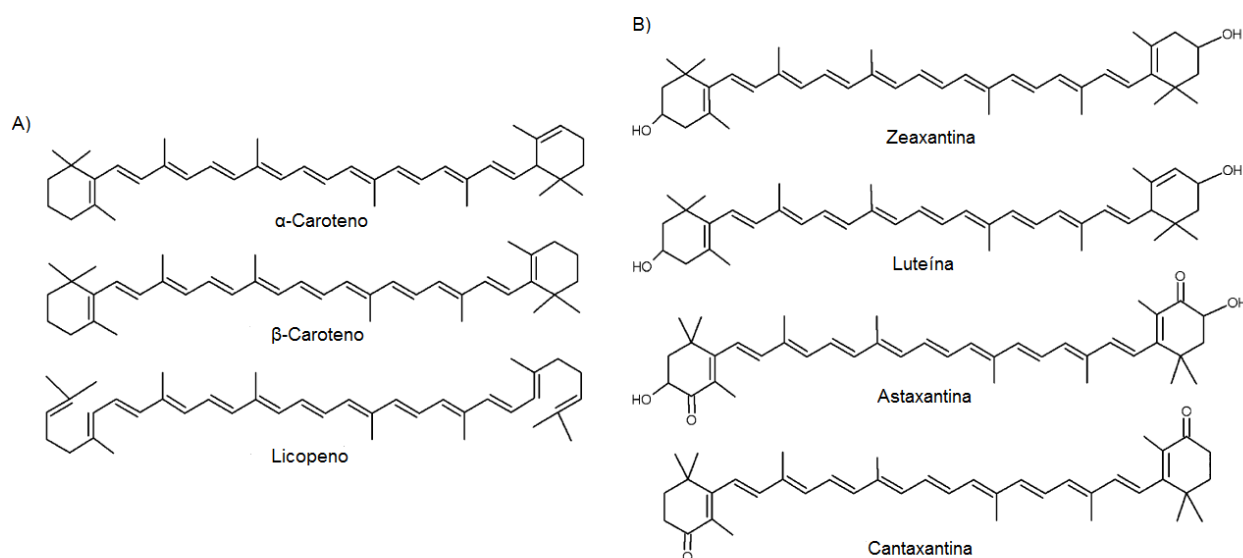
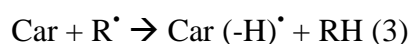


Figura 5: Estrutura química dos carotenoides. A) Carotenos, B) Xantofilas (oxicarotenoides), carotenoides com substituições que conferem maior hidrossolubilidade à molécula (Fonte: Adaptado de SKIBSTED, 2012).

Os animais não são capazes de sintetizar os carotenoides, porém os mesmos são importantes na proteção dos tecidos contra o estresse oxidativo e a exposição excessiva à luz (SKIBSTED, 2012). Para tanto, os animais necessitam obter os carotenoides a partir da dieta. Os carotenoides geralmente identificados no plasma humano são os

principais carotenoides vegetais: β -caroteno, α -caroteno, licopeno, β -criptoxantina, β -cantaxantina, luteína, zeaxantina e astaxantina (CERQUEIRA et al., 2007; WOOLLARD, 2012).

As características estruturais da molécula de carotenoides os tornam potentes antioxidantes (YOUNG e LOWE, 2001; DUTTA et al., 2005). A natureza e a posição dos substituintes na molécula determinam o tipo de reação induzida e capacidade antioxidante dos carotenoides. Eles podem interagir com os radicais livres de três formas distintas: (1) transferência de elétrons, (2) formação de um aduto com o radical e (3) transferência de um átomo de hidrogênio (YOUNG e LOWE, 2001; SKIBSTED, 2012).



A função dos carotenoides nos organismos fotossintéticos está associada à coloração, principalmente vermelho, laranja e amarelo (DUTTA et al., 2005). Devido à propriedade que essas moléculas possuem de absorver e refletir fótons, os carotenoides são responsáveis pela coloração de diversas estruturas vegetais. Cálculos teóricos indicam que a intensidade de cor do carotenoide pode ser relacionada ao seu potencial antioxidante. De acordo com esses estudos, carotenoides com a coloração vermelha intensa são antioxidantes menos eficientes que os carotenoides que apresentam a coloração menos vermelha e mais amarela (MARTINÉZ et al., 2009; SKIBSTED, 2012).

Compostos Fenólicos

Os compostos fenólicos ou polifenóis estão amplamente distribuídos no reino vegetal e são os metabólitos secundários mais abundantes, com mais de 8.000 estruturas conhecidas até o momento. Apesar da grande variabilidade estrutural entre os grupos e subgrupos de compostos fenólicos, a estrutura química dessas moléculas é caracterizada pela presença de um ou mais anéis aromáticos com um ou mais grupos hidroxila (DAI e MUMPER, 2010).

Os polifenóis são encontrados em todos os órgãos vegetais de plantas comestíveis e não-comestíveis e geralmente estão envolvidos na defesa contra a radiação UV ou agressão de patógenos, parasitas e predadores. Além de participar da proteção da planta, os compostos fenólicos são responsáveis pelas propriedades organolépticas e pela coloração dos vegetais (KÄHKÖNEN et al.,1999; HUDA-FAUJAN et al., 2009; DAI e MUMPER, 2010)

Devido à extensão e variedade de compostos, os polifenóis são divididos em grupos e subgrupos, de acordo com a figura 6. Os flavonoides são os compostos fenólicos mais consumidos a partir da dieta e são divididos em seis subgrupos, de acordo com o estado de oxidação do anel de carbono central. Os ácidos fenólicos e taninos são divididos em duas subclasses. Os estilbenos e as lignanas são compostos fenólicos mais raros (KÄHKÖNEN et al.,1999; DAI e MUMPER, 2010).

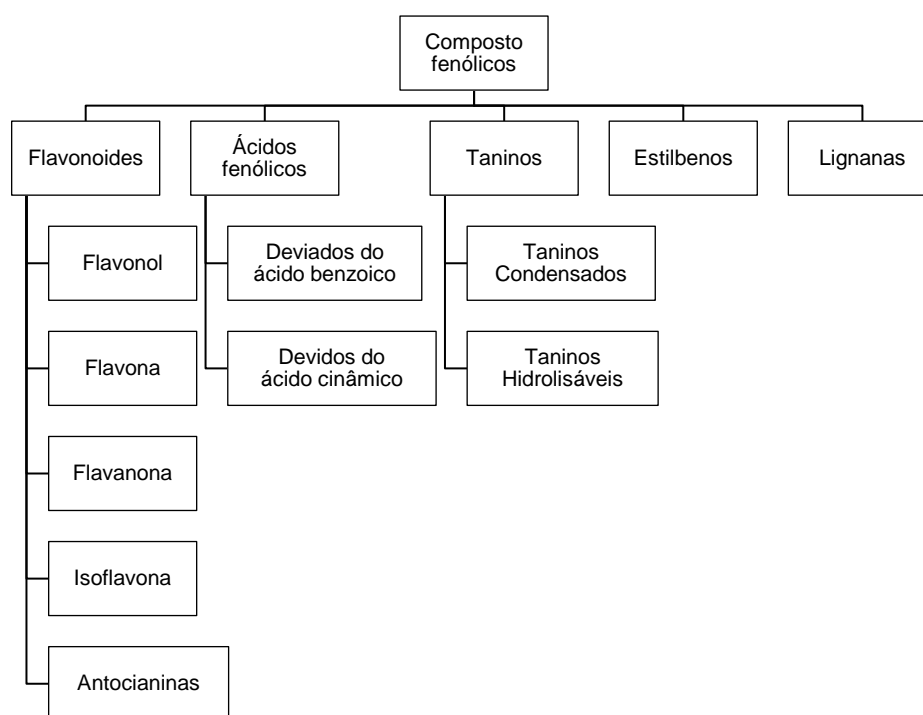


Figura 6: Grupos e subgrupos de compostos fenólicos (Fonte: Adaptação de DAI e MUMPER, 2010).

Os compostos fenólicos são considerados potentes antioxidantes e estudos indicam que, *in vitro*, apresentam atividade antioxidante mais proeminente que os carotenoides e as vitaminas C e E. Além disso, o consumo de alimentos de origem vegetal ricos em polifenóis está associado à diminuição do risco de doenças causadas

pelo estresse oxidativo como doenças cardiovasculares, câncer ou osteoporose (DAI e MUMPER, 2010).

O potencial antioxidante dos polifenóis está relacionado à capacidade aceptora de elétrons da molécula, visto que interferem com a oxidação de moléculas pela doação de átomos de hidrogênio aos radicais. O radical fenoxi (PO^{\bullet}), intermediário formado após a reação com o radical livre é uma molécula relativamente estável devido à ressonância do grupo fenoxi; portanto, impede que o PO^{\bullet} inicie uma nova cadeia de reações oxidativas (DAI e MUMPER, 2010).

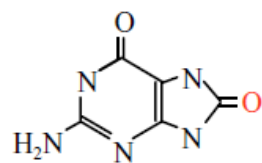
1.2.2. Danos às macromoléculas biológicas

DNA

Estima-se que ocorram todos os dias em todas as células humanas, aproximadamente 2×10^4 eventos associados a dano ao DNA, sendo uma parcela significativa causada por ERO. O estresse oxidativo é um fator determinante para o surgimento de instabilidade genômica, sobretudo quando ocorrem falhas no sistema de resposta ao dano no DNA (BARZILAI e YAMAMOTO, 2004).

Os danos no DNA promovidos pelo estresse oxidativo incluem a oxidação das bases nitrogenadas e da desoxirribose, além de quebras de fita simples e de fita dupla no DNA. As quebras de fita dupla podem ser letais se não reparadas, enquanto a oxidação de bases pode ser mutagênica e/ou citotóxica (SLUPPHAUG et al., 2003).

O estresse oxidativo está relacionado a mais de 20 tipos diferentes de danos a bases nitrogenadas do DNA. A lesão mais prevalente nas purinas é a formação da 7,8-dihidro-8-oxiguanina ou 8-oxoguanina (8-oxoG) (figura 7). Na reação oxidativa, o radical hidroxila (OH^{\bullet}) interage com a guanina (G) para formar o aducto C8-OH; posteriormente, a perda de um elétron (e^-) e um próton (H^+) forma a 8-oxoG (Figura 5) (SLUPPHAUG et al., 2003). A lesão oxidativa 8-oxoG resulta em sítios específicos de mutagênese e produz transversões $G \rightarrow T$ que são amplamente encontradas em genes supressores de tumor e proto-oncogenes mutados (LOUREIRO et al., 2002; KLAUNIG et al. 2010). Outros danos oxidativos a bases nitrogenadas do DNA como timina glicol, 5 hidroxideoxicitidina e análogos do uracil (ex.: 5-hidroxiuracil) estão associados a processos mutagênicos (SLUPPHAUG et al., 2003; KLAUNIG et al. 2010).



8-oxoguanina (8-oxoG)

Figura 7: 8-oxoguanina: lesão oxidativa promovida pela interação do radical livre OH^\cdot com a base nitrogenada guanina (Fonte: Adaptado de SLUPPHAUG et al., 2003).

Lipídios

A oxidação de lipídios por espécies reativas ocorre em três etapas: iniciação, progressão e terminação. Na fase inicial, o radical livre interage diretamente com os lipídios, por exemplo, os ácidos graxos poliinsaturados (AGPI) das membranas celulares. Na progressão, diversos compostos reativos podem ser formados, como hidrocarbonetos, ésteres, peróxidos, epóxidos e aldeídos (CERQUEIRA et al., 2007).

O aumento da peroxidação lipídica e a deficiência da proteção antioxidante permitem que os produtos reativos formados na progressão reajam com os centros nucleofílicos do DNA, de RNAs e de proteínas formando com essas moléculas ligações covalentes (VALKO et al., 2006). O malondialdeído e o 4-hidroxinonal são produtos da peroxidação lipídica especialmente nocivos, pois podem promover a ligação cruzada entre fosfolipídios, proteínas e DNA, causando a inativação dessas moléculas (CERQUEIRA et al., 2007).

Os átomos de hidrogênio dos ácidos graxos poliinsaturados da lipoproteína de baixa densidade (LDL) plasmática podem sofrer ataque oxidativo, promovendo uma cadeia de reações que culmina em uma lipoperoxidação extensiva (BAGNATI et al., 1999).

Proteínas

As espécies reativas podem causar modificações nas proteínas. Os aminoácidos mais sensíveis ao ataque de ROS são triptofano, tirosina, histidina e cisteína; porém praticamente todos os aminoácidos são alvos da oxidação por radicais livres (DRÖGE, 2002).

O processo de oxidação das proteínas pode induzir a mudanças na função proteica, fragmentação química, ou aumento da susceptibilidade ao ataque proteolítico, principalmente pelos proteassomos. Davies e Goldberg (1987) estimaram que a exposição ao íon superóxido ou ao peróxido de hidrogênio pode aumentar em 11 vezes as chances de degradação proteolítica.

1.2.3. Desordens associadas ao estresse oxidativo

Doenças neurodegenerativas

O cérebro humano corresponde a apenas 2% da massa corporal, porém é responsável por 20 a 50% do consumo total de oxigênio no organismo. A função do sistema nervoso central (SNC) é extremamente dependente do suprimento de oxigênio, visto que a demanda de energia dos neurônios deriva quase exclusivamente da cadeia respiratória transportadora de elétrons na mitocôndria (COYLE e PUTTFARCKEN, 1993).

Além do consumo exacerbado de oxigênio e a consequente formação de EROs, o cérebro contém grandes quantidades de AGPI, particularmente vulneráveis ao ataque de radicais livres. A progressão da peroxidação lipídica pode gerar diversos compostos tóxicos e reativos que podem promover a rigidez da membrana plasmática, alterar sua integridade e danificar a proteínas da membrana (COYLE e PUTTFARCKEN, 1993)

Devido à propensão do SNC ao estresse oxidativo, diversas desordens neurodegenerativas estão relacionadas a lesões oxidativas. Entre elas, a doença de Parkinson, o Alzheimer, a doença de Huntington e a Esclerose lateral amiotrófica (FUJITA et al., 2012).

Doenças cardiovasculares

As lipoproteínas de baixa densidade (LDL), circulantes no plasma sanguíneo, podem sofrer modificações oxidativas promovidas por radicais livres e outras espécies reativas. A oxidação dessas moléculas está associada ao desenvolvimento e a progressão de lesões ateroscleróticas (BAGNATI et al., 1999).

O estresse oxidativo está envolvido na patogênese de diversas doenças cardiovasculares, incluindo a hipercolesterolemia, a aterosclerose, a hipertensão, a diabetes e a insuficiência cardíaca (CAI e HARRISON, 2000).

Envelhecimento

O estresse oxidativo está associado ao processo de envelhecimento através de diversos mecanismos. A disfunção celular induzida por danos oxidativos nas macromoléculas do organismo é o principal fator causal do processo de envelhecimento (ZHANG et al., 2009). Os danos ao DNA causados pelo estresse oxidativo, inclusive ao DNA mitocondrial, e os mecanismos de reparo insuficientes contribuem para envelhecimento precoce (MEISSNER, 2007; BERTRAM e HASS, 2008). As quebras nas fitas-simples de DNA em locais específicos da região telomérica causadas por danos oxidativos e mecanismos de reparo ineficazes, induzem ao encurtamento do telômero e, conseqüentemente, ao envelhecimento celular (PASSOS et al., 2007). Portanto, é amplamente aceito que o estresse oxidativo está envolvido nos processos de envelhecimento e desenvolvimento de doenças relacionadas à idade (CUTLER e MATTSON, 2006).

Carcinogênese

Os radicais livres e outras espécies reativas podem atuar nas células como moléculas anticâncer – por exemplo: promovendo a paralização do ciclo celular, a senescência, a apoptose, a necrose e inibindo a angiogênese – ou como moléculas que induzem ao câncer; promovendo a proliferação, a invasividade, a angiogênese, a metástase e suprimindo a apoptose. Um exemplo da dualidade de funções das espécies reativas no câncer é a ação do óxido nítrico (NO) e outras ERN que podem promover danos ao DNA causando mutações e inibir as caspases (atrasando a apoptose), caracterizando-o como um agente indutor do câncer, ou podem atuar inibindo a citocromo oxidase e diminuir a formação de ATP, prejudicando a proliferação celular e desacelerando o crescimento tumoral (HALLIWELL, 2007).

As ERO podem produzir diretamente quebras em fitas simples e duplas de DNA, modificações em purinas, pirimidinas e desoxirriboses, além de ligações cruzadas na sequência de DNA. Danos persistentes ao DNA podem resultar na indução ou

interrupção da transcrição, indução das vias de transdução de sinais, erros na replicação e instabilidade genômica. Todas as anormalidades decorrentes do dano ao DNA por ERO estão associadas à carcinogênese (KLAUNIG e KAMENDULIS, 2004).

1.3. Antineoplásicos e estresse oxidativo

O estresse oxidativo está relacionado à quimioterapia, visto que vários antineoplásicos são capazes de produzir grandes quantidades de ERO. As antraciclínas (doxorubicina, epirrubicina e a daunorrubicina) são os antineoplásicos que apresentam maior propensão a desencadear o estresse oxidativo no organismo; no entanto, os agentes alquilantes, os compostos de coordenação com platina, as epipodofilotoxinas e as camptotecinas também são responsáveis pelo estresse oxidativo associado ao tratamento quimioterápico (CONKLIN, 2004).

As ERO são capazes de induzir a apoptose a partir dos danos causados às macromoléculas biológicas (sobretudo ao DNA); porém, evidências sugerem que não são essenciais para o mecanismo de ação dos antineoplásicos, pois o aumento dessas espécies reativas ocorre após o comprometimento da célula com a morte programada (CONKLIN, 2004). O mecanismo de ação da doxorubicina para induzir a apoptose na célula tumoral consiste, principalmente, na inibição da enzima topoisomerase II e a formação de adutos com o DNA, que resultam no bloqueio da síntese de DNA e RNA e na fragmentação do DNA (SWIFT et al., 2006).

Os produtos do estresse oxidativo podem interferir no mecanismo de ação dos quimioterápicos, principalmente através dos aldeídos (produtos da lipoperoxidação), que podem inibir a apoptose induzida pelo antineoplásico pela inativação dos receptores de morte e inativação das caspases (CONKLIN, 2004). Além disso, o estresse oxidativo está associado à cardiotoxicidade induzida pelas antraciclínas, sendo o responsável pelos danos letais aos cardiomiócitos. Apesar da eficácia e abrangência, a toxicidade cardíaca é a principal limitação clínica das antraciclínas (L'ECUYER et al., 2006).

1.4. Ensaio de Mutagênese e Genotoxicidade

Os radicais livres, assim como diversos compostos naturais ou medicamentos, podem interagir com o DNA causando danos. Os danos podem ser eliminados pelo sistema de reparo do DNA ou podem persistir induzindo a genotoxicidade e até mesmo

a mutagênese. Para acessar os efeitos mutagênicos e genotóxicos de inúmeros compostos, os testes do cometa e do micronúcleo estão bem estabelecidos e indicam a extensão e gravidade da interação dos compostos estudados com DNA (WONG et al, 2005; ASARE et al., 2011).

1.4.1. Teste do Cometa

O teste do cometa ou “*single cell gel assay eletrophoresis*” (SCGE) tornou-se o método padrão para avaliar o dano ao DNA e, conseqüentemente, o efeito genotóxico de inúmeros compostos em diversas áreas de estudo (COLLINS, 2004). O teste foi introduzido em 1984 por Östling e Johanson com uma técnica microeletroforética para a visualização direta de danos ao DNA induzidos por radiação gama em células individuais. As imagens do DNA obtidas no teste se assemelhavam a um cometa (figura 9), característica responsável pela denominação do ensaio. Foi observado no teste que a amplitude de DNA liberado do nucleóide ou cabeça do cometa durante a eletroforese estava relacionada com a intensidade da radiação (ÖSTLING e JOHANSON, 1984).

A princípio, no teste realizado por Östling e Johanson, o pH das soluções utilizadas não passava de 10 e o poder adstringente da solução de lise não era apropriado para remover todas as proteínas associadas ao DNA. Dessa forma, era possível notar a formação de um “halo” em torno do nucleóide constituído de uma série de alças superenoveladas de DNA desprovido de histonas, porém aderidos à matriz celular residual (COOK et al., 1976; COLLINS, 2004), sendo um método sensível para a detecção de quebras de fitas simples (FAIRBAIRN et al., 1995).

A eletroforese alcalina foi introduzida Singh et al. (1988) como uma metodologia modificada do teste do cometa neutro. O pH elevado (>12,3) é geralmente utilizado para facilitar a desnaturação e o desempacotamento do DNA, assim como as quebras decorrentes de lesões em sítios alcali-lábeis (FAIRBAIRN et al., 1995). O uso de condições neutras e alcalinas afeta o DNA de diferentes maneiras. Após as condições neutras, a cauda do cometa consiste de alças relaxadas de DNA, enquanto a cauda em condições alcalinas é formada a partir de fragmentos de DNA (KLAUDE et al., 1996).

O método é baseado na migração do DNA em uma matriz de agarose sob condições eletroforéticas (HARTMANN et al., 2003). Os fragmentos de DNA apresentam extremidades carregadas negativamente que migram livremente no campo elétrico em direção ao ânodo (FAIRBAIRN et al., 1995).

O princípio que determina a formação padrão do cometa é a habilidade que o fragmento de DNA possui de migrar em função tanto do seu tamanho, quanto ao número de quebras nas extremidades ligadas a porções maiores de DNA que podem migrar por curtas distâncias a partir da cabeça do cometa. A cauda formada pelos fragmentos ou quebras nas extremidades de DNA aumenta conforme a intensidade do dano (FAIRBAIRN et al., 1995).

Os principais passos da metodologia são (HARTMANN et al., 2003):

- (1) preparação das lâminas de microscopia recobertas com uma camada de células em meio a agarose;
- (2) solução de lise detergente e saturada de sais para romper a membrana das células e liberar o DNA;
- (3) desempacotamento do DNA e formação de quebras de fita simples em sítios alcali-lábeis através de uma solução com pH elevado;
- (4) eletroforese;
- (5) neutralização do pH alcalino;
- (6) fixação com álcool etílico;
- (7) coloração com um composto intercalante de DNA.

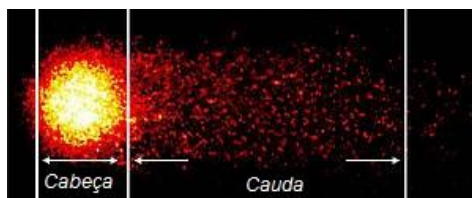


Figura 8: Representação do nucleóide no teste do cometa. Na cabeça do cometa se entra o DNA enovelado e na cauda os fragmentos de DNA. (Adaptado de: *The Comet Assay* – Department of Toxicology (http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/en/general_information/).

1.4.2. Teste do Micronúcleo

Os micronúcleos, também conhecidos como corpúsculos de Howell-Jolly, foram originalmente identificados e descritos nos eritrócitos. O micronúcleo pode ser originado de três formas: (1) fragmentos cromossômicos acêntricos, (2) fragmentos acêntricos da cromátide ou (3) cromossomos inteiros que falharam na inclusão no núcleo das células filhas durante a mitose porque eles não se ligaram apropriadamente

ao fuso mitótico durante o processo de segregação na anáfase (FENECH et al., 2011). Esses cromossomos ou fragmentos de cromossomos deslocados são pequenas esferas de cromatina incluídas pela membrana nuclear e encontradas no citoplasma externamente ao núcleo principal. Os micronúcleos são morfologicamente similares ao núcleo, apresentando o mesmo formato e as mesmas propriedades de coloração (JAGETIA e REDDY, 2002).

Os efeitos mutagênicos e clastogênicos geralmente surgem após a exposição a agentes genotóxicos (GOCKE et al., 2012); para tanto, o teste do micronúcleo é apresentado como um desfecho citogenético eficiente para avaliar os danos cromossômicos induzidos por mutágenos e carcinógenos (JAGETIA e REDDY, 2002). Os micronúcleos são indicadores de instabilidade cromossômica. Em células tumorais, células com defeitos no sistema de reparo do DNA e células nas quais o maquinário de controle do ciclo celular é interrompido, a frequência de micronúcleos é maior (TERRADAS et al., 2010).

O teste do micronúcleo *in vivo* foi desenvolvido por Schmid (1975) principalmente para estudar a quebra cromossômica induzida por agentes químicos, através da avaliação da frequência de micronúcleos encontrados nos eritrócitos policromáticos da medula óssea de camundongos. O ensaio é amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (responsáveis pela fragmentação cromossômica) e de agentes aneugênicos (que induzem a segregação cromossômica anormal durante a mitose ou meiose) (Figuras 9 e 10) (RIBEIRO et al., 2003).

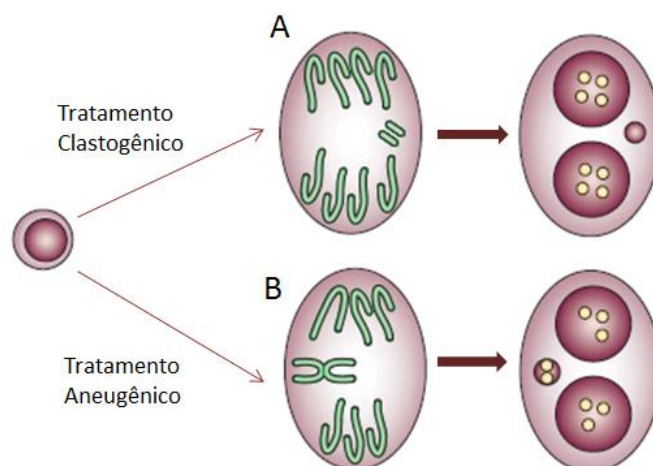


Figura 9: Modelo esquemático de formação do micronúcleo. As sondas centroméricas (em amarelo) auxiliam na identificação do tipo de instabilidade genômica e na distinção entre os efeitos clastogênicos e aneugênicos. (A) O micronúcleo foi originado de um fragmento

cromossômico acêntrico; (B) O micronúcleo foi originado da perda de um cromossomo inteiro (Modificado de Fenech, 2007).

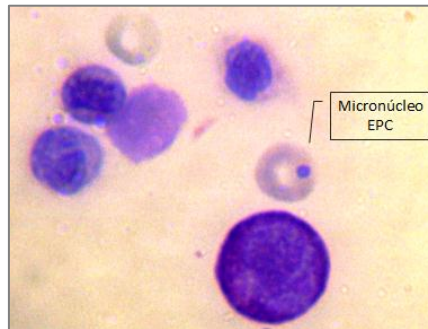


Figura 10: Micronúcleo em eritrócito policromático corado com Giemsa. Imagem capturada em microscópio de luz com aumento 1000x.

O consumo de antioxidantes naturais está associado à diminuição dos danos oxidativo às macromoléculas biológicas. Devido ao conteúdo de compostos fenólicos, carotenoides e vitaminas na polpa do pequi, acredita-se que a suplementação com os extratos do fruto são capazes de inibir os efeitos deletérios das espécies reativas, sobretudo os danos oxidativo relacionados ao tratamento com antineoplásicos como a doxorubicina.

2. OBJETIVOS

2.1. Geral

Avaliar os efeitos genotóxicos, o potencial antioxidante e antígenotóxico e as alterações hematológicas promovidas pelo tratamento com o óleo e os extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso da polpa do fruto do pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.), em camundongos Swiss de ambos os sexos.

2.2. Específicos

- Pesquisar o teor de compostos fenólicos totais e carotenoides totais no óleo e nos extratos da polpa do pequi.
- Acessar, por meio do teste de DPPH, a ação antioxidante *in vitro* do óleo e dos extratos.
- Verificar o efeito protetor do óleo e dos extratos contra os efeitos pró-oxidantes e genotóxicos da doxorrubicina
- Avaliar o potencial antioxidante *in vivo* através do teste TBARS, realizado no plasma dos camundongos.
- Verificar os possíveis efeitos genotóxico e antígenotóxico do óleo e dos extratos, utilizando, para tanto, os teste do cometa e o ensaio do micronúcleo.
- Analisar as alterações hematológicas através do estudo do hemograma, leucograma e plaquetograma completos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção do óleo e dos extratos da polpa do pequi

Os frutos selecionados para a obtenção dos extratos brutos da polpa do fruto do pequi foram adquiridos no comércio local de Brasília/DF. Após a remoção do epicarpo e do mesocarpo externo, o fruto (mesocarpo interno aderido ao endocarpo) foi armazenado sob refrigeração (-20°C) em um compartimento protegido da luz. A separação do mesocarpo interno (polpa) do endocarpo foi realizada somente no momento da extração, para preservar os constituintes da polpa.

O extrato aquoso (AQ) foi obtido pelo processo de infusão durante 10 minutos. Os extratos hidroetanólico (HE) e etanólico (ET) foram obtidos por maceração dinâmica a frio durante 24 horas.

A moagem da polpa foi realizada em um processador de alimentos doméstico para reduzir o tamanho dos fragmentos e aumentar a superfície de contato da polpa com o solvente. A extração foi realizada com 100 g da polpa processada em 1000 mL de solvente. Os solventes utilizados foram: água destilada no AQ, água destilada:etanol (1:1) no HE e etanol P.A no ET.

As soluções extrativas foram recuperadas por filtração em papel de filtro no funil de Büchner acoplado ao Kitassato, à pressão reduzida. A solução extrativa aquosa foi congelada e, posteriormente, liofilizada para a obtenção do extrato aquoso. As soluções extrativas etanólica e hidroetanólica foram concentradas no rotaevaporador (Rotavapor® RII, Büchi Labortechnik AG). A solução extrativa hidroetanólica foi posteriormente congelada e liofilizada para a obtenção do extrato HE, enquanto a solução extrativa etanólica foi levada ao concentrador/evaporador centrífugo SpeedVac® para a remoção de qualquer resquício de etanol e obtenção do extrato ET.

O óleo da polpa do pequi foi produzido pela empresa Farmacotécnica por meio do processo de extração mecânica de compressão e centrifugação para a obtenção do óleo extravirgem.

Os extratos e o óleo foram armazenados sob refrigeração (-20°C) e protegidos da luz até o momento do uso. O óleo extravirgem e o extrato etanólico, após o procedimento para obtenção do extrato bruto, apresentaram-se na forma de um líquido viscoso ou oleoso; enquanto os extratos hidroetanólico e aquoso foram obtidos na forma sólida após a liofilização.

3.2. Caracterização fitoquímica

3.2.1. Carotenoides totais

O teor de carotenoides totais no óleo e nos extratos da polpa do pequi foi quantificado no Laboratório de Análises em Alimentos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen – Brasília/DF), de acordo com a metodologia descrita por Higby (1962). O óleo e o extrato etanólico foram pesados e diluídos em éter de petróleo. O extrato aquoso e o hidroetanólico, insolúveis em éter de petróleo, foram pesados e diluídos em uma solução de água e acetona (1:1) e submetidos a extração líquido-líquido em funil de separação com éter de petróleo. Após a separação de fases, a fração etérea foi coletada. Para a leitura da absorbância no espectrofotômetro, realizou-se a varredura nos comprimentos de onda de 250 a 700 nm. Para calcular o teor de carotenoides totais nas amostras, considerou-se a absorbância da anteraxantina a 1 g.mL^{-1} , cujo coeficiente de extinção é igual a 2350 (RIBEIRO, 2011).

3.2.2. Compostos fenólicos totais

Os compostos fenólicos totais foram determinados de acordo com o método de Folin-Cicalteou, que detecta todas as classes de compostos poli-hidroxifenólicos solúveis em água (TURKMEN et al., 2006; ROCHA et al, 2011). A curva de calibração foi construída a partir da absorbância de concentrações crescentes de ácido gálico (ácido fenólico utilizado como padrão) a 760 nm (Figura 11). O óleo e o extrato etanólico foram diluídos em etanol P.A, enquanto os extratos hidroetanólico e aquoso foram diluídos em uma solução etanol:água (7:3). Após a reação das amostras diluídas com o reagente de Folin-Ciocalteou em meio alcalino, realizou-se a leitura no espectrofotômetro a 760 nm. O teor de compostos fenólicos totais foi calculado a partir da equação da reta obtida na curva de calibração de ácido gálico e os resultados foram expressos em mg de ácido gálico equivalente (GAE). g^{-1} da amostra. A análise foi realizada no Laboratório de Análises em Alimentos na Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia (Embrapa/Cenargen – Brasília/DF).

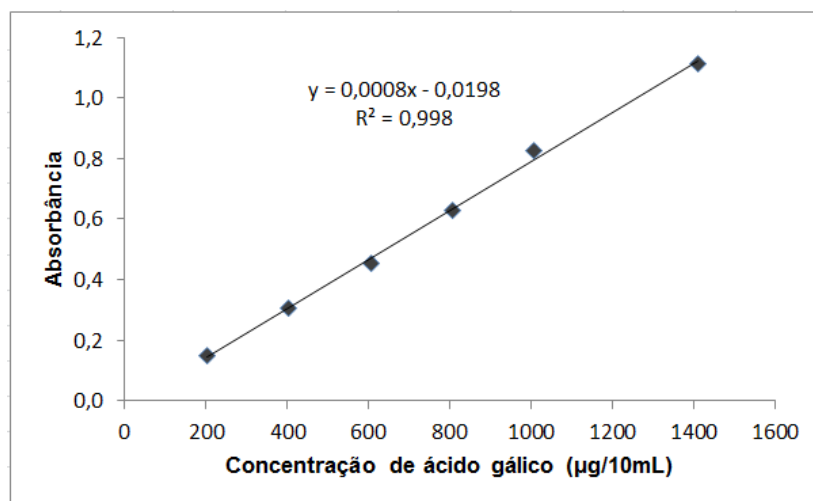


Figura 11: Curva de calibração do ácido gálico para a determinação de compostos fenólicos totais no óleo e nos extratos da polpa de pequi.

3.2.3. Quantificação de minerais

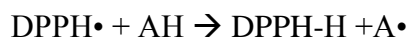
Os macronutrientes e micronutrientes no óleo e nos extratos da polpa de pequi foram quantificados pelo Laboratório de Agroquímica e Meio Ambiente da Universidade Estadual de Maringá (UEM). A metodologia empregada para a determinação de potássio (K), cálcio (Ca), magnésio (Mg), cobre (Cu), ferro (Fe), manganês (Mn) e zinco (Zn) foi a espectrometria de absorção atômica e para o fósforo total (P), espectrometria UV-Vis. Anteriormente à análise, todas as amostras foram digeridas por solução nitroperclórica.

3.3. Avaliação da atividade antioxidante *in vitro*

3.3.1. Teste do DPPH

A capacidade antioxidante do óleo e dos extratos da polpa de pequi foi avaliada através do método do radical livre 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH), descrito por Brand-William et al. (1995) e adaptado por Razali et al. (2008) e Atmani et al. (2009). O DPPH é um radical livre estável que apresenta um elétron desemparelhado que se apresenta deslocalizado pela molécula. Além da estabilidade, a deslocalização eletrônica confere a coloração violeta ao composto, cuja absorbância pode ser mensurada nos comprimentos de onda de 515 a 520 nm. Quando a solução de DPPH entra em contato com uma substância capaz de doar um átomo de hidrogênio (composto

antioxidante) o radical DPPH (DPPH•) é reduzido, ocorrendo a perda da coloração violeta e permanecendo apenas a coloração amarela do grupo picril (MOLYNEUX, 2003). A interação entre o DPPH• e o composto doador de hidrogênio (AH) ocorre da seguinte forma:



Para a execução da metodologia, o óleo e os extratos foram pesados e diluídos em metanol. Devido à imiscibilidade das amostras no solvente, as suspensões (amostras + metanol) foram agitadas e, posteriormente, centrifugadas a 1000 rpm durante 10 segundos para a separação das fases. Apenas o sobrenadante, solúvel em metanol, foi coletado para a interação com o DPPH. A concentração da solução de DPPH diluído em metanol foi de 0,04 mg/mL. Para a reação, utilizou-se 900 µL da solução de DPPH e 100 µL do óleo ou dos extratos diluídos em metanol, nas concentrações de 0,5 a 500 mg/mL. A mistura reagiu durante 20 minutos em local protegido da luz. Foram utilizados como controles: o antioxidante BHT (Merk) e a vitamina C comercial Citroplex® (Neoquímica). Após a reação, as absorvâncias das amostras das diluições de BHT e vitamina C em metanol, da solução de DPPH e das reações (amostras + DPPH) foram mensuradas no espectrofotômetro (Molecular Devices Spectramax M2) no comprimento de onda de 517 nm. As análises foram realizadas em triplicata. Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição do radical DPPH (% inibição), utilizando-se as absorvâncias para o cálculo através da fórmula:

$$\% \text{ inibicao} = \frac{[A_0 - (A_1 - A_s)]}{A_0} \times 100$$

A0: absorvância do DPPH

A1: absorvância do DPPH + óleo ou extratos diluídos

As: absorvância do óleo ou dos extratos diluídos

Os valores de % inibição das diluições foram utilizadas para calcular o EC50 (concentração mínima para reduzir em 50% o radical DPPH) através de regressão não-linear.

3.4. Ensaios biológicos

3.4.1. Animais

Nos experimentos, foram utilizados camundongos da linhagem Swiss de ambos os sexos, procedentes do Biotério Central da Unicamp/SP -Cemib, com 10 a 12 semanas de vida e massa corporal de $34,96\text{g} \pm 4,23\text{g}$. Os animais foram mantidos no alojamento do Departamento de Genética e Morfologia/ UnB em caixas plásticas (mini-isoladores em racks ventilados da Alesco®) à temperatura ambiente ($22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$) com água e ração *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo comitê de ética no uso de animais (CEUA) da Faculdade de Saúde da Universidade de Brasília, UnBDoc número 5330/2011 (Anexo 1).

3.4.2. Desenho Experimental

Os animais foram divididos em 20 grupos ($n=5$ por grupo), sendo 10 grupos compostos por fêmeas (F) e 10 por machos (M). Os extratos e o óleo foram administrados aos camundongos via oral com auxílio de uma pipeta automática durante 10 dias consecutivos. A dose administrada do extrato etanólico e do óleo foi de $30\ \mu\text{L}/\text{animal}/\text{dia}$ e dos extratos aquoso e hidroetanólico foi de $30\ \text{mg}/\text{animal}/\text{dia}$, diluídos em água destilada na concentração de $1\ \text{mg}/\mu\text{L}$, sendo administrados para os animais $30\ \mu\text{L}/\text{animal}/\text{dia}$.

Os grupos OP, ET, HE e AQ foram tratados apenas com o óleo ou com o respectivo extrato de pequi, enquanto os grupos OP-DX, ET-DX, HE-DX e AQ-DX, além do tratamento com óleo ou extrato, receberam o quimioterápico doxorrubicina (DX) 48 horas antes da eutanásia. A administração de $40\ \text{mg}/\text{kg}$ de DX intraperitoneal, concomitantemente com os extratos e o óleo de pequi foi realizada para avaliar o potencial protetor das substâncias testadas (RESENDE et al., 2006; MIRANDA-VILELA et al., 2008; FURTADO et al., 2008). O grupo controle negativo de fêmeas (CNF) e o grupo controle negativo de machos (CNM) foram tratados com $30\ \mu\text{L}/\text{animal}/\text{dia}$ de água filtrada via oral durante 10 dias consecutivos. O grupo controle positivo de fêmeas (CPF) e o grupo controle positivo de machos (CPM) foram tratados com $30\ \mu\text{L}/\text{animal}/\text{dia}$ de água filtrada durante 10 dias consecutivos via oral e com 40

mg/kg de DX intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia. A tabela 5 indica os grupos experimentais e seus respectivos tratamentos.

Tabela 5: Grupos experimentais (n=5 por grupo) e os respectivos tratamentos.

Grupos		Tratamento
Fêmeas	Machos	
CN(F)	CN(M)	Água filtrada
CP(F)	CP(M)	Água filtrada + DX
OP(F)	OP(M)	Óleo
ET(F)	ET(M)	Extrato etanólico
HE(F)	HE(M)	Extrato hidroetanólico
AQ(F)	AQ(M)DX	Extrato aquoso
OP(F)DX	OP(M)DX	Óleo + DX
ET(F)DX	ET(M)DX	Extrato etanólico + DX
HE(F)DX	HE(M)DX	Extrato hidroetanólico + DX
AQ(F)DX	AQ(M)DX	Extrato aquoso + DX

CN(F): controle negativo fêmeas, CN(M): controle negativo machos, CP(F): controle positivo fêmeas, CP(M): controle positivo machos, DX: doxorubicina.

3.4.3. Coleta do sangue e medula óssea

Após anestesia com ketamina (80 mg/kg) e xilazina (10 mg/kg), os animais foram submetidos à punção cardíaca para a coleta do sangue e a remoção dos fêmures para a obtenção da medula óssea. A solução anestésica foi aplicada pela via intraperitoneal com o volume de 120 µL/animal. A punção cardíaca foi realizada com uma seringa estéril com EDTA e o sangue coletado (600 µL) foi transferido para um microtubo de 1,5 mL contendo 60 µL (proporção de 1:10 do sangue coletado) de solução anticoagulante de EDTA sódico 20%.

Posteriormente à exsanguinação e eutanásia por deslocamento cervical, feita de acordo com as Orientações sobre Eutanásia da Associação Médica Veterinária (AVMA, 2007), os fêmures foram removidos, as epífises cortadas e a medula óssea removida do fêmur com o auxílio de uma seringa com soro bovino fetal (SBF) para a realização do teste do micronúcleo (SCHMID, 1975) (Figura 12).

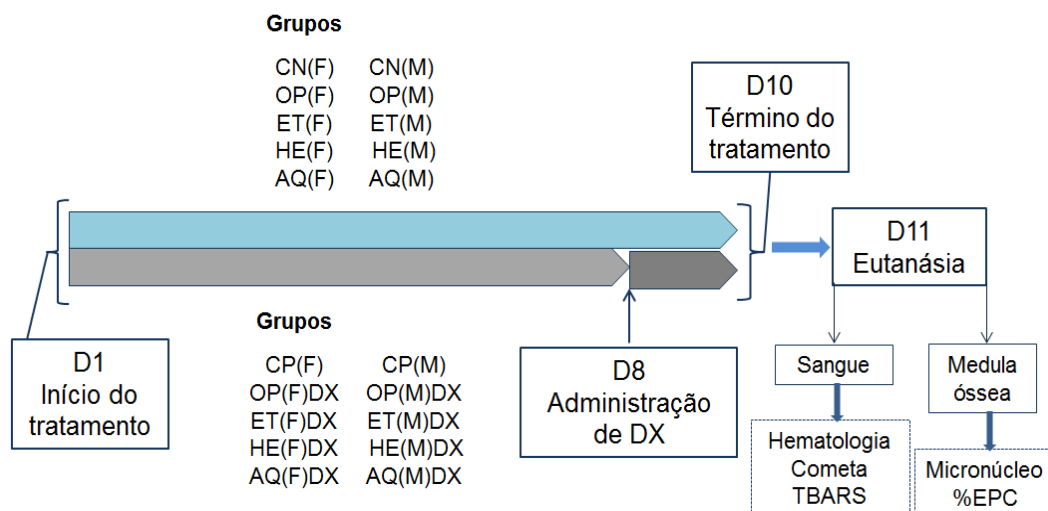


Figura 12: Esquema ilustrativo do delineamento experimental. D: dia; DX: doxorubicina; %EPC: porcentagem de eritrócitos policromáticos.

3.4.4. Avaliação hematológica

As amostras de sangue dos camundongos com o anticoagulante EDTA sódico 20% foram levemente homogeneizadas por inversão e, logo após, processadas no analisador hematológico automatizado Sysmex Poch 100iV Diff™ calibrado para camundongos. Os parâmetros hematológicos do eritrograma, do leucograma e do plaquetograma foram avaliados.

3.4.5. Teste do cometa

O teste do cometa ou eletroforese em gel de célula única (*single cell gel electrophoresis assay* – SCGE) foi realizado de acordo com o método proposto por Singh et al. (1988), com alterações. Primeiramente, lâminas para microscópio com a extremidade fosca foram imersas em solução de agarose normal a 1,5%. Em um microtubo de 1,5 mL, misturou-se 240 µL de solução de agarose de baixo ponto de ebulição (*low melting*) 0,5% a 37 °C e 60 µL de sangue. Após a homogeneização, a mistura foi adicionada às lâminas previamente preparadas com agarose normal (2 lâminas/animal). Para facilitar o espalhamento do sangue com agarose sobre a lâmina, uma lamínula foi colocada sobre a mistura. A lâmina preparada permaneceu durante 20 minutos a 4°C para a secagem da mistura de sangue com agarose. Após a solidificação, a lamínula foi removida e a lâmina com amostra foi adicionada à solução de lise em um

recipiente protegido da luz previamente refrigerado a 4°C. A solução de lise foi preparada com NaCl 2,5 M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, N-lauroyl sarcosine 1%, pH 10, Triton X-100 1% e DMSO 10%. As lâminas permaneceram na solução de lise a 4°C durante 24 horas, até o momento da eletroforese. As lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese e permaneceram submersas em solução tampão alcalina (NaOH 300 mM e EDTA 1 mM, pH > 13) a 4°C durante 30 minutos. Após esse período, iniciou-se a eletroforese a 25 V/300 mA durante 30 minutos. A seguir, as lâminas foram imersas na solução tampão de neutralização (Tris 0,4 M, pH 7,5) em 3 ciclos de 5 minutos dentro da solução e 5 minutos fora da solução de neutralização. As lâminas neutralizadas foram mantidas à temperatura ambiente durante 1 hora para a secagem antes da fixação com álcool etílico P.A durante 5 minutos, sendo então armazenadas a 4°C até o momento da análise.

As lâminas foram analisadas no microscópio de fluorescência Axioskope 2 Zeiss (filtro de 510 – 560 nm, barreira de filtro 590 nm e aumento de 400x) com a utilização do corante intercalante de DNA, brometo de etídeo a 20 µg/mL. A avaliação da fragmentação de DNA foi efetuada por meio da análise visual dos nucleóides, baseando-se na classificação de 0 a 4 de acordo com intensidade de fragmentação (Collins et al., 1995). Para cada animal, 100 células foram classificadas e o índice de dano (ID) calculado de acordo com o proposto por Jalszyński et al. (1997), a partir da fórmula:

$$ID = \frac{(classe\ 1 \times 1) + (classe\ 2 \times 2) + (classe\ 3 \times 3) + (classe\ 4 \times 4)}{total\ de\ células\ analisadas} \times 100$$

3.4.6. Teste do micronúcleo e citotoxicidade

A frequência de micronúcleos foi avaliada nos eritrócitos policromáticos (EPC) e normocromáticos (ENC) da medula óssea dos camundongos, assim como a relação de EPC/ENC para avaliar a citotoxicidade dos tratamentos. Para a obtenção da medula óssea os fêmures foram removidos, as epífises cortadas, com o auxílio de uma seringa contendo 1 mL de soro bovino fetal (SBF), e as células da medula óssea do fêmur foram transferidas para um tubo Falcon de 15 mL. A suspensão com as células e o SBF foi homogeneizada e, posteriormente, centrifugada a 1000 rpm durante 10 minutos. O

sobrenadante foi removido e o sedimento (*pellet*) foi ressuspensionado com 50 µL de SFB. O esfregaço foi confeccionado com 10 µL do homogeneizado por lâmina (2 lâminas/animal). As lâminas prontas permaneceram 24 horas à temperatura ambiente para a secagem e foram fixadas com álcool metílico durante 10 minutos. Para a coloração, utilizou-se a solução estoque de Giemsa diluída em tampão fosfato de Sorensen na proporção 1:10 durante 12 minutos.

As lâminas coradas foram analisadas no microscópio de luz Olympus BH2 com aumento de 1000x. Para cada animal, 4000 células foram contadas com o auxílio de um contador manual. A frequência de micronúcleos foi avaliada em 2000 ENC e 2000 EPC, de acordo com a diretriz 474 da OECD (1997). A citotoxicidade foi avaliada pela percentagem de EPC (%EPC); para tanto, no momento em que uma das populações de eritrócitos atingiu a marca de 2000 células durante a contagem, as quantidades de ENC e EPC foram registradas e a %EPC foi calculada através da fórmula:

$$\%EPC = \frac{EPC}{EPC + ENC} \times 100$$

3.4.7. Teste das substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS)

A peroxidação lipídica é um indicador de estresse oxidativo em células e tecidos. O malonaldeído (MDA) é o principal e mais estudado produto da peroxidação de ácidos graxos poli-insaturados e, portanto, é amplamente utilizado como marcador biológico de peroxidação lipídica e estresse oxidativo (DEL RIO et al., 2005). O princípio do TBARS se baseia na interação entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (ATB). A condensação das moléculas de MDA e ATB forma um aduto que pode ser facilmente identificado por espectrofotometria ou fluorimetria, permitindo a avaliação da peroxidação lipídica através do Tbars (JANERO, 1990) (figura 13).

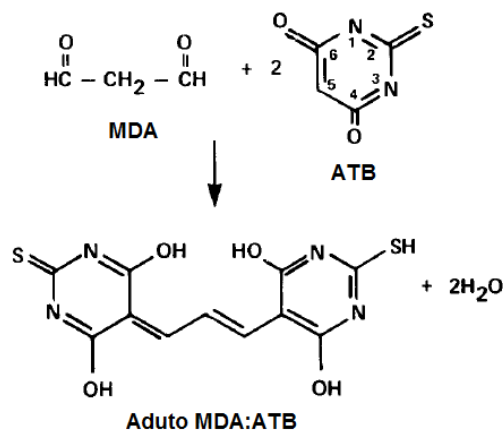


Figura 13: Aduto formado através reação de adição nucleofílica entre o malondialdeído (MDA) e ácido tiobarbitúrico (ATB), em meio ácido submetido ao calor. (Adaptado de Janero, 1990).

A concentração de MDA no plasma dos animais foi determinada pelo Tbars, utilizando-se o kit TBARS Assay Kit® (Cayman Chemical Company). O sangue coletado foi centrifugado a 4000 rpm durante 10 minutos a 4° C, o plasma foi transferido para um microtubo de 1,5 mL e 20 µL de solução antioxidante (GSH 0,65 mM e EDTA 1,34 mM) foi acrescentada à amostra. O plasma permaneceu congelado a -80°C até o momento do teste. O procedimento do método foi seguido de acordo com o protocolo fornecido pelo kit. Após a reação descrita pelo protocolo, a leitura das amostras foi realizada no comprimento de onda de 535 nm no espectrofotômetro.

3.4.8. Análises estatísticas

O cálculo do EC₅₀ (concentração mínima capaz de inibir 50% do radical livre) a partir da porcentagem de inibição (% inibição) do radical livre no ensaio do DPPH com o óleo e os extratos da polpa de pequi foi realizado no programa Graphpad Prism 5, utilizando-se, para tanto, a regressão não linear.

As demais análises estatísticas foram realizadas usando o software aplicativo SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*) versão 17.0. Os dados foram expressos como média ± desvio padrão (DP) e valores de p<0,05 foram considerados estatisticamente significativos. As variáveis contínuas foram testadas para distribuição normal com o teste de Shapiro-Wilk. Possíveis diferenças entre os grupos analisados foram investigadas pelos testes ANOVA ou Kruskal-Wallis (quando os dados não estavam normalmente distribuídos). Para resultados significativos com ANOVA, o teste

Bonferroni foi escolhido para realizar as comparações múltiplas. Para os resultados significativos com o teste de Kruskal-Wallis, foi usado o teste de Mann-Whitney para verificar diferenças entre os tratamentos (comparações 2 a 2). Para os testes com camundongos, os valores de p com significado estatístico ($p < 0,05$) só foram considerados quando também assumiram sentido biológico e, para tanto, atenderam aos seguintes critérios:

- Controles negativo e positivo comparados com todos os tratamentos;
- Tratamentos com o óleo e demais extratos de pequi comparados com os respectivos tratamentos com doxorrubicina;
- Tratamentos com o óleo e demais extratos de pequi comparados entre si;
- Tratamentos com o óleo e demais extratos de pequi + doxorrubicina comparados entre si;
- Comparação entre fêmeas e machos para os mesmos tratamentos.

4. RESULTADOS

4.1. Caracterização química

Os carotenoides foram detectados somente no óleo e no extrato etanólico da polpa de pequi. As concentrações médias de carotenoides totais encontrados no óleo e no extrato etanólico foram $277,47 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ e $1721,70 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, respectivamente. Comparando-se os valores encontrados nas amostras analisadas, houve uma diferença estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) entre o teor de carotenoides totais nas amostras. Os compostos fenólicos foram detectados nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso. A concentração média de fenólicos totais foi mais elevada no extrato aquoso ($75,92 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$), seguida pelo extrato hidroetanólico ($70,90 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$). O teor no extrato etanólico foi de $20,06 \text{ mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$ (Tabela 6).

Tabela 6: Teor de carotenoides totais e compostos fenólicos totais no óleo e nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso da polpa de pequi.

Amostra	Carotenoides totais ($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	Compostos fenólicos totais ($\text{mg GAE}\cdot\text{g}^{-1}$)
Óleo	$277,47 \pm 1,12$	n.d.
Extrato etanólico	$1721,70 \pm 55,69^{***a}$	$20,06 \pm 0,50$
Extrato hidroetanólico	n.d.	$70,90 \pm 1,41^{***b}$
Extrato aquoso	n.d.	$75,92 \pm 1,31^{***b,***c}$
P-valores (total)	0,027	0,000

Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP). GAE: ácido gálico equivalente; n.d.: não detectado. O teste-t para amostras independentes foi utilizado para calcular o p-valor do teor de carotenoides totais, sendo a: significativo comparado ao óleo. ANOVA gerou os p-valores de compostos fenólicos totais. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Bonferroni para os compostos fenólicos, sendo b: significativo comparado ao extrato etanólico; c: significativo comparado ao extrato hidroetanólico. Os asteriscos indicam as diferenças significativas: $**p < 0,01$ e $***p < 0,001$.

A composição de minerais nas amostras da polpa do pequi, determinadas por espectrometria de absorção atômica e espectrometria UV-Vis, encontram-se na tabela 7. No extrato etanólico e no óleo não foram detectados os minerais: fósforo (P) e cobre (Cu), enquanto o ferro (Fe) não foi detectado nos extratos hidroetanólico e aquoso. O manganês (Mn) não foi encontrado no extrato hidroetanólico. Os outros componentes químicos foram encontrados em todas as amostras em diferentes concentrações.

Tabela 7: Determinação de minerais no óleo e nos extratos etanólicos, hidroetanólico e aquoso da polpa de pequi.

Amostra	Macronutrientes (g.kg ⁻¹)				Micronutrientes (mg.kg ⁻¹)			
	Mg	Ca	K	P	Fe	Cu	Mn	Zn
Óleo	0,114	0,97	0,042	nd	186,8	nd	2,02	2,03
Ext. etanólico	0,116	0,442	0,099	nd	26,13	nd	8,22	3,39
Ext. hidroetanólico	2,71	2,98	16,41	3,33	nd	41,92	nd	59,32
Ext. aquoso	1,31	2,64	9,11	1,72	nd	11,36	6,90	25,13

n.d.: não detectado.

4.2. Capacidade antioxidante *in vitro*

O potencial antioxidante do óleo e dos extratos da polpa de pequi foi avaliado por meio do teste do DPPH. A porcentagem de inibição do radical promovida pela amostra permitiu o cálculo da EC₅₀ (concentração necessária para reduzir 50% do radical DPPH). Os valores de EC₅₀ (mg/mL) das amostras e dos controles se encontram na tabela 8.

Tabela 8: Capacidade antioxidante do óleo e dos extratos da polpa de pequi e dos controles BHT e vitamina C, utilizando-se o teste de DPPH.

Amostras	EC ₅₀ (mg/mL)	IC 95%
BHT	0,0006	0,0056 a 0,00652
Vitamina C	0,012	0,0103 a 0,0145
Óleo	26,26	21,99 a 31,36
Extrato etanólico	8,00	6,104 a 10,48
Extrato hidroetanólico	7,53	5,601 a 10,12
Extrato Aquoso	8,57	7,405 a 9,916

BHT: hidroxitolueno butilado; EC₅₀: concentração mínima para reduzir 50% do DPPH. IC 95%: intervalo de confiança de 95%.

O BHT e a vitamina C foram utilizados como controles, devido ao conhecimento bem estabelecido da atividade antioxidante desses compostos *in vitro*. O óleo e os extratos demonstraram um potencial antioxidante em relação ao radical DPPH, porém com atividade reduzida quando comparada aos controles. Entre as amostras da polpa de pequi, o óleo apresentou a menor atividade, sendo necessária uma concentração mais elevada de óleo para desempenhar a mesma ação antioxidante que os extratos.

4.3. Ensaio biológicos

4.3.1. Massa corporal antes e após o tratamento

A massa corporal média dos animais de ambos os sexos antes do tratamento foi de $34,96 \pm 4,23$ g e após $34,60 \pm 5,92$ g. Nas fêmeas, a média foi de $31,89 \pm 2,80$ g antes e $31,14 \pm 3,23$ g após o tratamento, enquanto nos machos a média foi de $38,16 \pm 2,87$ g e $38,19 \pm 5,96$ g, respectivamente. O gráfico da figura 14 representa a massa corpórea antes e após o tratamento, com as respectivas médias e desvios-padrão, assim como as diferenças de pesos estatisticamente significativas entre os grupos.

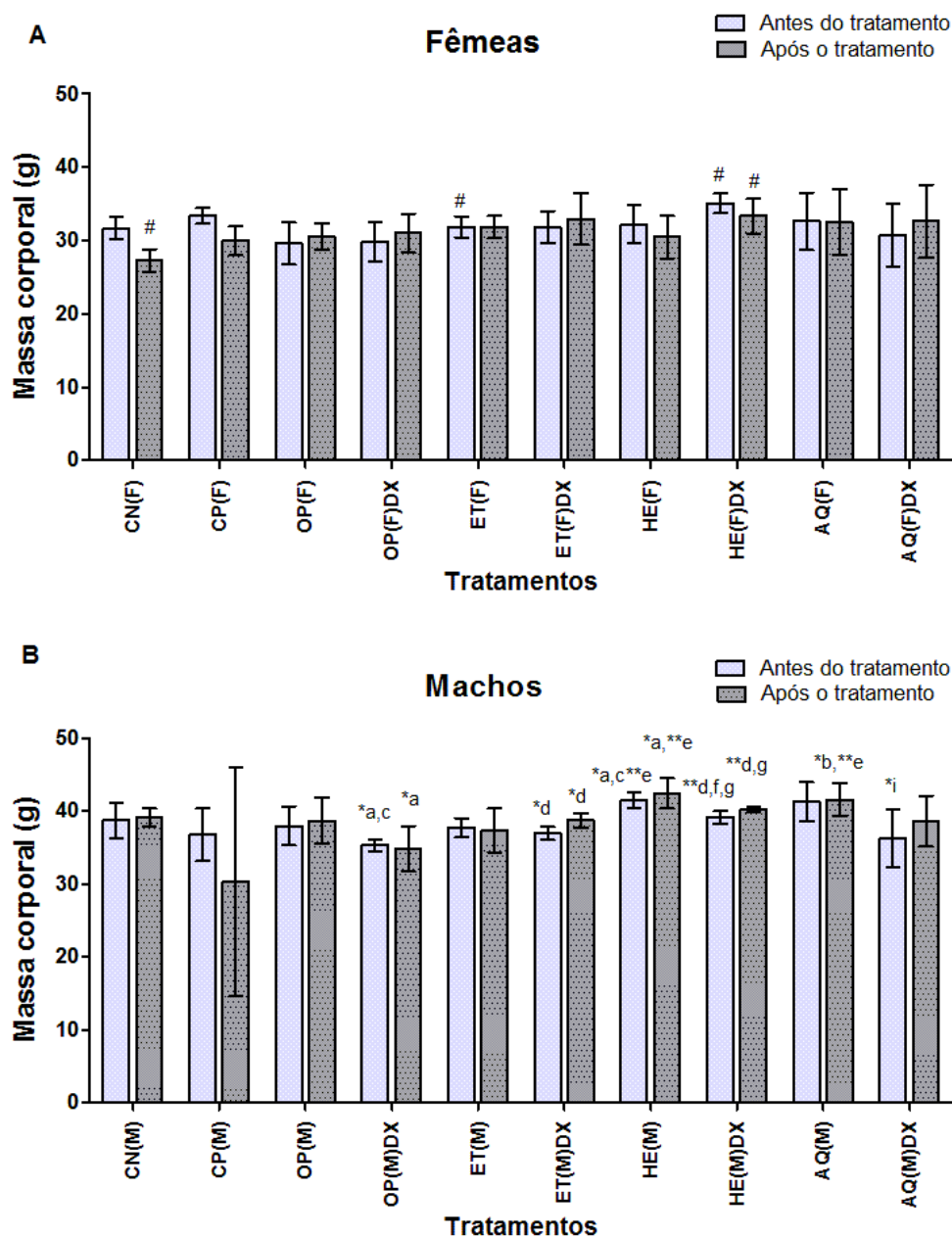


Figura 14: Massa corporal dos camundongos fêmeas e machos, antes e após o tratamento com o óleo ou extratos da polpa do pequi ou com associação óleo ou extratos + doxorubicina. Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP). Os p-valores de fêmeas foram gerados por ANOVA enquanto os p-valores de machos e do grupo total foram gerados pelo teste de Kruskal-Wallis. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Bonferroni ou Mann-Whitney, sendo a= significativo comparado ao grupo CN; b=significativo comparado ao grupo CP; c= significativo comparado ao grupo OP; d= significativo comparado ao grupo OP-DX; e= significativo comparado ao grupo ET; f= significativo comparado ao grupo ET-DX; g= significativo comparado ao grupo HE; h= significativo comparado ao grupo HE-DX; i= significativo comparado ao grupo AQ. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) ou altamente significativas (** $p < 0,01$). O símbolo # indica diferenças significativas entre machos e fêmeas para os mesmos tratamentos.

4.3.2. Teste de TBARS

Os resultados obtidos a partir do teste de TBARS no plasma dos camundongos se encontram na tabela 8. Os dados representados foram a média e o desvio padrão das concentrações de MDA (μM) e a intensidade de hemólise no plasma de cada um dos grupos. Visto que o grau de hemólise interfere no teste (PYLES et al., 1993), superestimando as concentrações de MDA no plasma, graus de intensidade foram atribuídos à extensão da hemólise, representados de forma crescente de 0 a 4 cruces (+).

Tabela 9 – Resultados do teste de Tbars em camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 µL/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg de doxorrubicina (DX) intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia.

Grupo	Tratamento	Hemólise	Concentração de MDA (µM)
1	CN(F)	+	11,04 ± 3,21 [#]
2	CP(F)		11,09 ± 2,84 [#]
3	OP(F)	+++	18,35 ± 7,61 ^{*a,b}
4	OP(F)DX	++	14,88 ± 4,87 ^{*a,b}
5	ET(F)	++++	17,07 ± 2,55 ^{**a,b#}
6	ET(F)DX	++	12,32 ± 1,77 ^{**e}
7	HE(F)	++++	17,16 ± 6,27 ^{**a,b}
8	HE(F)DX	++	11,88 ± 3,19 ^{*g}
9	AQ(F)	+	11,39 ± 3,28 ^{**c,e,g#}
10	AQ(F)DX	+	12,39 ± 2,63 [#]
P-valores			0,000
11	CN(M)	+++	17,99 ± 7,41
12	CP(M)	++	15,20 ± 4,42
13	OP(M)	++++	18,21 ± 4,72
14	OP(M)DX	++	12,16 ± 5,65 ^{*a,**c}
15	ET(M)	++++	28,99 ± 7,86 ^{**a,b,c}
16	ET(M)DX	++	11,67 ± 1,36 ^{**a,b,e}
17	HE(M)	++	18,91 ± 7,07 ^{*b,**e}
18	HE(M)DX	+	12,94 ± 2,63 ^{*a,**g}
19	AQ(M)	++	14,31 ± 3,50 ^{*c,**e}
20	AQ(M)DX	++	17,01 ± 3,29 ^{*d,**f,h}
P-valores			0,000
P-valores (Total)			0,000

Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP) e a intensidade de hemólise no plasma. CN=controle negativo; CP=controle positivo; OP=tratamento com óleo de pequi; ET=tratamento com extrato etanólico; HE=tratamento com extrato hidroetanólico; AQ=tratamento com extrato aquoso; DX=doxorrubicina; F=fêmeas; M=machos; MDA=malonaldeído. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para gerar todos os p-valores. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Mann-Whitney, sendo a=significativo comparado ao grupo CN; b=significativo comparado ao grupo CP; c=significativo comparado ao grupo OP; d=significativo comparado ao grupo OP-DX; e=significativo comparado ao grupo ET; f=significativo comparado ao grupo ET-DX; g=significativo comparado ao grupo HE; h=significativo comparado ao grupo HE-DX. Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) ou altamente significativas (**p<0,01). O símbolo # indica diferenças significativas entre machos e fêmeas para os mesmos tratamentos.

Quando os tratamentos foram comparados entre os sexos, houve um aumento significativo nas concentrações de MDA nos camundongos machos dos controles negativo e positivo e dos tratamentos ET, AQ e AQ-DX. Entre as fêmeas não houve diferença significativa entre os controles negativo e positivo. No entanto, os grupos OP(F), OP(F)DX, ET(F) e HE(F) apresentaram um aumento significativo tanto em

relação ao CN(F), quanto em relação ao CP. O aumento na concentração de MDA nesses grupos está associado ao aumento no grau de intensidade da hemólise.

Nos machos, assim como nas fêmeas, não foram observadas diferenças significativas entre os controles negativo e positivo. Apesar da associação com o quimioterápico DX, os grupos OP(M)DX, ET(M)DX E HE(M)DX apresentaram níveis mais baixos de MDA no plasma que o CN(M), enquanto o ET(M) demonstrou aumento na concentração de MDA em relação ao CN(M). Comparando-se ao CP(M), o grupo ET(M)DX apresentou uma inibição da peroxidação lipídica, no entanto os níveis de MDA nos grupos ET(M) e HE(M) foram aumentados. Analisando-se de forma conjunta as concentrações de MDA e a intensidade de hemólise no plasma dos animais, percebe-se que o aumento na peroxidação lipídica foi relacionada ao aumento da hemólise, exceto na diferença na concentração de MDA entre os grupos ET(M)DX e CP(M), que apresentaram o mesmo grau de hemólise.

O tratamento concomitante com a DX visou avaliar o potencial protetor do óleo e dos extratos de pequi em relação aos danos oxidativos promovidos pelo quimioterápico. No entanto, devido ao elevado grau de hemólise no plasma dos grupos OP(F), OP(M), ET(F), ET(M), HE(F) e HE(M), os tratamentos apenas com o óleo ou com os extratos da polpa de pequi promoveram um aumento nas concentrações de MDA quando comparados aos grupos que foram tratados com os mesmos extratos ou com o óleo conjuntamente com a DX. Comparando-se o tratamento isolado ou associado, os grupos OP(F) e OP(F)DX não apresentaram diferenças estatísticas; porém os grupos ET(F) e HE(F) apresentaram concentrações de MDA mais elevadas que os grupos ET(F)DX e HE(F)DX, respectivamente. Nos grupos OP(M), ET(M) e HE(M) os níveis de MDA no plasma foram maiores que dos grupos OP(M)DX, ET(M)DX e HE(M)DX, respectivamente.

4.3.3. Avaliação hematológica

4.3.3.1. Eritrograma

Quando os parâmetros do eritrograma foram comparados entre os sexos, houve um aumento nos valores de eritrócitos, hemoglobina (HGB) e hematócrito (HCT) e uma diminuição da concentração hemoglobínica corpuscular média (CHCM) no grupo controle negativo das fêmeas em relação ao grupo controle negativo dos machos.

Entre os controles positivos de fêmeas e machos, os parâmetros HGB, HCT, volume corpuscular médio (VCM), hemoglobina corpuscular média (HCM) e CHCM foram estatisticamente superiores nas fêmeas. Nos machos, o controle positivo apresentou valores de VCM e HCM significativamente aumentados em relação ao controle negativo.

Em relação ao tratamento com óleo de pequi ou óleo de pequi associado à doxorrubicina (DX), quando comparados ao controle negativo, o grupo OP(F) apresentou um aumento significativo dos valores de VCM e HCM, enquanto demonstrou uma diminuição da amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (RDW) em relação ao controle positivo. A associação do óleo a DX promoveu reduções significativas na concentração de HGB em relação ao CN(F) e HCM comparada ao CP(F). Comparando-se o grupo ET(F)DX com o ET(F), houve uma redução nos parâmetros HCM e CHCM. Nos machos, comparando-se ao controle negativo, os grupos OP(M) e OP(M)DX apresentaram uma diminuição do VCM. O CHCM foi reduzido apenas no grupo OP(M).

O tratamento com o extrato etanólico associado a DX promoveu uma redução significativa na contagem de eritrócitos nas fêmeas comparado ao CN(F), e nos machos comparado ao CP(M). A HGB apresentou uma diminuição nos grupos ET(F)DX e ET(M)DX em relação ao controle negativo; no entanto, apenas o grupo ET(F)DX demonstrou uma redução em relação ao controle positivo. O HCT do grupo ET(F)DX foi inferior ao CN(F), porém houve um aumento no HCM quando o grupo ET(F) foi comparado ao CN(F). Comparando-se os grupos ET(F)DX e ET(F) houve uma redução nos seguintes parâmetros, devido à associação com a DX: HGB, HCM, CHCM. A associação do extrato com a DX promoveu a diminuição do CHCM nos machos comparados ao CN(M). O VCM do grupo ET(M)DX foi significativamente inferior ao CN(M). A administração do extrato etanólico com a DX promoveu um decréscimo nos valores de RDW em comparação ao tratamento apenas com o extrato nos machos.

Nas fêmeas tratadas com o extrato hidroetanólico concomitantemente com a DX, ocorreram reduções significativas, quando comparadas CN(F), nos seguintes parâmetros: eritrócitos, HGB e RDW. Quando comparadas ao CP(F), houve redução no HCM e no RDW. Entre os machos, o grupo HE(M)DX apresentou valores de HGB, VCM e CHCM inferiores ao CN(M). O grupo HE(M) também apresentou uma redução na CHCM comparada ao CN(M).

Em relação ao extrato aquoso, o tratamento associado a DX promoveu uma redução na contagem de eritrócitos e RDW e um aumento no VCM no grupo AQ(F)DX em relação ao CN(F). Quando comparados ao CP(F), os grupos AQ(F) e AQ(F)DX apresentaram valores reduzidos de RDW. Comparando-se o tratamento associado ao tratamento apenas com o extrato hidroetanólico nas fêmeas, houve uma redução do VCM nos animais tratados com a associação. Nos camundongos machos do grupo AQ(M), tratados apenas com o extrato aquoso, houve uma diminuição da contagem de eritrócitos, HGB e CHCM em relação ao CN(M), sendo que os valores de HGB ficaram abaixo dos valores de referência (12-15 g/dL) reportados na literatura para camundongos (VIANA, 2007). Comparando-se o grupo ao CP(M), apenas a contagem de eritrócitos foi inferior. O grupo AQ(M)DX apresentou valores elevados de HGB, VCM e CHCM em relação ao CN(M) (Tabela 10).

Tabela 10 - Resultados do eritrograma de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 µL/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg de doxorubicina (DX) intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia.

Grupo	Tratamento	Eritrócitos (x 10 ⁶ /µL)	HGB (g/dL)	HCT (%)	VCM (fL)	HCM (pg)	CHCM (g/dL)	RDW (%)
1	CN(F)	8,99 ± 0,38 [#]	13,10 ± 0,58 [#]	32,23 ± 1,45 [#]	35,87 ± 0,68	14,58 ± 0,27	40,63 ± 0,62 [#]	14,48 ± 0,56
2	CP(F)	8,64 ± 0,41	12,87 ± 0,66 [#]	31,58 ± 1,68 [#]	36,57 ± 0,81 [#]	14,90 ± 0,36 [#]	40,73 ± 0,33 [#]	15,07 ± 0,73
3	OP(F)	8,70 ± 0,51	13,26 ± 0,92	32,30 ± 2,07	37,04 ± 0,68 ^{*a}	15,24 ± 0,36 ^{**a}	41,04 ± 0,90	13,20 ± 0,34 ^{**b}
4	OP(F)DX	8,35 ± 0,63	11,92 ± 0,83 ^{*a}	30,12 ± 2,22	36,10 ± 0,19	14,30 ± 0,12 ^{*b,**c}	39,58 ± 0,33 ^{*c}	14,18 ± 0,53
5	ET(F)	8,63 ± 0,09	12,92 ± 0,22	31,34 ± 0,90	36,30 ± 0,87 [#]	14,98 ± 0,16 ^{*a,#}	41,26 ± 0,79	14,36 ± 0,81
6	ET(F)DX	8,29 ± 0,46 ^{*a}	11,90 ± 0,63 ^{*a,b,e}	29,96 ± 1,55 ^{*a}	36,14 ± 0,98	14,36 ± 0,51 ^{*e}	39,72 ± 0,33 ^{*e}	13,86 ± 0,62
7	HE(F)	8,73 ± 0,41	12,64 ± 0,58	31,34 ± 1,73	35,92 ± 1,14	14,52 ± 0,68 [#]	40,36 ± 1,17	14,26 ± 0,76 ^{**b}
8	HE(F)DX	8,51 ± 0,15 ^{*a}	12,26 ± 0,33 ^{*a}	30,56 ± 0,78	35,92 ± 0,41	14,42 ± 0,19 ^{*b}	40,12 ± 0,43	13,08 ± 0,42 ^{*a,b}
9	AQ(F)	8,83 ± 0,48	12,90 ± 0,55	31,68 ± 1,70	35,88 ± 0,33 ^{*c}	14,62 ± 0,28 ^{*c}	40,74 ± 0,61 [#]	13,24 ± 0,44 ^{**b}
10	AQ(F)DX	8,14 ± 1,01 ^{*a}	12,06 ± 1,40	30,14 ± 3,62	37,04 ± 0,48 ^{*a,d,f,h,i}	14,84 ± 0,30 ^{*d,#}	40,04 ± 0,51	12,86 ± 0,81 ^{**a,b}
P-valores		0,133	0,020	0,295	0,049	0,003	0,002	0,000
11	CN(M)	7,87 ± 0,28	12,52 ± 0,46	30,76 ± 1,24	39,10 ± 0,39	15,94 ± 0,23	40,70 ± 0,44	14,54 ± 0,66
12	CP(M)	8,43 ± 0,48	12,04 ± 1,14	30,54 ± 2,13	36,22 ± 0,85 ^{**a}	14,28 ± 0,56 ^{**a}	39,38 ± 1,65	14,34 ± 0,67
13	OP(M)	8,17 ± 0,83	11,92 ± 1,27	29,98 ± 3,17	36,68 ± 0,68 ^{*a}	14,60 ± 0,35 ^{**a}	39,76 ± 0,27 ^{**a}	13,54 ± 1,49
14	OP(M)DX	8,02 ± 1,28	11,66 ± 2,05	29,02 ± 4,34	36,20 ± 0,64 ^{**a}	14,48 ± 0,41 ^{**a}	40,08 ± 1,53	15,44 ± 1,90
15	ET(M)	7,87 ± 1,05	11,60 ± 1,35	29,44 ± 2,43	37,68 ± 2,57	14,76 ± 0,42 ^{**a}	39,32 ± 1,84	17,70 ± 3,83 ^{*c}
16	ET(M)DX	7,81 ± 0,32 ^{*b}	11,12 ± 0,50 ^{**a}	28,64 ± 1,31	36,66 ± 0,36 ^{*a}	14,22 ± 0,22 ^{**a}	38,84 ± 0,65 ^{**a}	14,00 ± 0,47 ^{*e}
17	HE(M)	8,28 ± 0,63	12,02 ± 1,24	31,00 ± 2,41	37,42 ± 0,84	14,42 ± 0,50 ^{**a}	38,54 ± 0,88 ^{**a}	14,56 ± 0,31
18	HE(M)DX	8,30 ± 0,38	11,82 ± 0,61 ^{*a,f}	30,28 ± 1,52	36,50 ± 0,82 ^{*a}	14,22 ± 0,54 ^{**a}	39,04 ± 0,75 ^{**a}	13,80 ± 0,73
19	AQ(M)	7,40 ± 0,10 ^{*a,**b}	10,80 ± 0,36 ^{**a}	27,76 ± 0,92	37,52 ± 0,90	14,60 ± 0,33 ^{**a}	38,92 ± 0,70 ^{**a}	15,72 ± 1,50
20	AQ(M)DX	8,00 ± 0,29	11,28 ± 0,49 ^{**a}	28,86 ± 1,10	36,18 ± 0,22 ^{**a}	14,08 ± 0,15 ^{**a}	38,96 ± 0,22 ^{**a}	13,52 ± 1,33
P-valores		0,114	0,084	0,417	0,001	0,000	0,035	0,006
P-valores (Total)		0,002	0,000	0,024	0,001	0,000	0,000	0,561

Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP). CN=controle negativo; CP=controle positivo; OP=tratamento com óleo de pequi; ET=tratamento com extrato etanólico; HE=tratamento com extrato hidroetanólico; AQ=tratamento com extrato aquoso; F=fêmeas; M=machos; HGB=Hemoglobina; HCT=Hematócito; VCM=Volume Corpuscular Médio; HCM=Hemoglobina Corpuscular Média; CHCM=Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média; RDW=amplitude ou variação da distribuição do tamanho dos eritrócitos (do inglês *Red Cell Distribution Width*); g/dL=gramas por decilitros; fL=fentolitros; pg=picograma. ANOVA (em azul) foi usada para gerar os p-valores de CHCM e RDW de fêmeas, de HCT, VCM, HCM e RDW de machos, e de RDW do grupo total, enquanto o teste de Kruskal-Wallis (em preto) foi usado para gerar os demais p-valores. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Bonferroni ou Mann-Whitney, sendo a=significativo comparado ao grupo CN; b=significativo comparado ao grupo CP; c=significativo comparado ao grupo OP; d=significativo comparado ao grupo OP-DX;

e=significativo comparado ao grupo ET; f=significativo comparado ao grupo ET-DX; g=significativo comparado ao grupo HE; h=significativo comparado ao grupo HE-DX; i=significativo comparado ao grupo AQ. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) ou altamente significativas (** $p < 0,01$). O símbolo # indica diferenças significativas entre machos e fêmeas para os mesmos tratamentos.

4.3.3.2. Leucograma

A avaliação dos parâmetros do leucograma não demonstrou diferenças estatisticamente significativas, quando comparados entre os sexos, os controles negativos e positivos. Nas fêmeas, a porcentagem de linfócitos do controle positivo sofreu uma redução em relação ao controle negativo; enquanto os machos do controle positivo apresentaram valores de leucócitos totais inferiores aos do controle negativo.

O tratamento com óleo de pequi e DX promoveu a redução dos leucócitos totais, nas fêmeas, quando comparados aos grupos CN(F) e OP(F). Os linfócitos do grupo OP(F) foram significativamente mais elevados em relação ao CP(F). Nos machos, o tratamento de óleo associado a DX induziu a diminuição dos leucócitos totais e dos linfócitos em relação ao CN(M), porém a porcentagem de eosinófilos foi significativamente mais elevada. Comparando-se o tratamento com o óleo apenas e com a associação óleo/DX, houve um aumento na porcentagem de neutrófilos + monócitos no grupo OP(F).

Em relação ao extrato etanólico, o tratamento apenas com o extrato promoveu a elevação dos leucócitos totais quando comparados ao CN(F) nas fêmeas e ao CP(M) nos machos. Além disso, o extrato etanólico induziu a elevação da porcentagem de linfócitos nas fêmeas, comparadas ao CP(F). Nos machos, também houve um aumento em relação ao CN(M). A porcentagem de neutrófilos apresentou um decréscimo significativo com o extrato etanólico em relação ao CP(F) nas fêmeas. O mesmo fenômeno foi observado nos machos quando comparados aos grupos CN(M) e CP(M). Em ambos os sexos, a associação do extrato etanólico à DX promoveu a redução de leucócitos totais e linfócitos e o aumento dos neutrófilos + monócitos, quando comparados ao tratamento apenas com o extrato. O grupo ET(M)DX apresentou um decréscimo de leucócitos totais em relação ao CN(M) e um aumento quando comparado ao CP(M).

O tratamento apenas com o extrato hidroetanólico promoveu o aumento da porcentagem de linfócitos, tanto nas fêmeas quanto nos machos, quando comparados ao controle positivo. Nos machos os linfócitos também se apresentaram mais elevados em relação ao CN(M). Comparando-se o grupo HE(M) aos controles negativo e positivo, houve uma redução significativa na porcentagem de neutrófilos + monócitos. Nas fêmeas, o tratamento concomitante com DX diminuiu significativamente os linfócitos, quando comparados ao CN(F) e ao HE(F); no entanto houve um aumento da

porcentagem de neutrófilos + monócitos, comparando-se os mesmos grupos. Em relação aos machos, o tratamento associado à DX promoveu a redução dos leucócitos totais comparados ao CN(M). O grupo HE(M)DX apresentou valores reduzidos de linfócitos e elevados de neutrófilos + monócitos em relação ao grupo HE(M).

O tratamento com o extrato aquoso promoveu o aumento dos leucócitos totais, nos machos, em relação ao CP(M). Comparando-se os grupos tratados apenas com o extrato aquoso, houve um aumento significativo na porcentagem de linfócitos, em ambos os sexos, quando comparados ao controle positivo. Em relação ao controle negativo, apenas os machos tratados apresentaram um aumento na porcentagem de linfócitos. A porcentagem de neutrófilos + monócitos apresentou uma redução significativa em relação ao controle positivo nas fêmeas e ao controle negativo nos machos. O tratamento com o extrato e a DX promoveu a diminuição dos leucócitos totais nos machos em relação aos grupos CN(M) e AQ(M). Ademais, houve redução nos valores de linfócitos e aumento nos valores de neutrófilos + monócitos, em ambos os sexos, quando comparados ao tratamento apenas com o extrato aquoso. Em relação à porcentagem de eosinófilos, apenas a comparação entre AQ(M)DX e AQ(M) demonstrou diferenças significativas, indicando a elevação dos valores de eosinófilos no grupo AQ(M)DX comparado ao AQ(M) (Tabela 11).

Tabela 11 – Resultados do leucograma de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 µL/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorubicina (DX) intraperitoneal, 48 horas antes da eutanásia.

Grupo	Tratamento	Leucócitos totais (x 10 ³ /µL)	Linfócitos (%)	Neutrófilos + Monócitos (%)	Eosinófilos (%)
1	CN(F)	3,83 ± 1,66	73,58 ± 7,04	25,65 ± 7,36	0,77 ± 1,20
2	CP(F)	3,93 ± 2,60	64,08 ± 5,50 ^{*a}	34,03 ± 4,32	1,88 ± 2,32
3	OP(F)	5,78 ± 2,35	76,76 ± 7,12 ^{*b,#}	21,32 ± 5,26	1,92 ± 2,25
4	OP(F)DX	2,18 ± 0,71 ^{*a,**c}	71,92 ± 8,43 [#]	27,54 ± 8,51 [#]	0,54 ± 0,42
5	ET(F)	6,72 ± 1,70 ^{*a,#}	81,28 ± 6,02 ^{*b,#}	17,32 ± 4,21 ^{**b}	1,40 ± 3,13
6	ET(F)DX	2,44 ± 0,88 ^{**e}	67,24 ± 10,46 ^{*e,#}	31,90 ± 10,07 ^{*c}	0,86 ± 1,10
7	HE(F)	5,54 ± 3,39	77,98 ± 5,97 ^{*b}	21,60 ± 5,83	0,42 ± 0,59
8	HE(F)DX	2,96 ± 0,84 [#]	57,92 ± 5,16 ^{*a,d,g,#}	41,24 ± 5,10 ^{*a,**g,#}	0,84 ± 0,31 [#]
9	AQ(F)	2,68 ± 1,76 ^{*c,e,#}	81,30 ± 9,77 ^{*b,#}	16,98 ± 7,42 ^{**b}	1,72 ± 2,86
10	AQ(F)DX	3,28 ± 0,68 [#]	62,80 ± 5,39 ^{*a,d,i,#}	36,10 ± 5,06 ^{**i,#}	1,10 ± 1,19 [#]
	P-valores	0,004	0,001	0,000	0,608
11	CN(M)	6,98 ± 0,75	54,7 ± 12,95	44,96 ± 12,56	0,30 ± 0,48
12	CP(M)	2,52 ± 0,33 ^{**a}	43,78 ± 21,38	43,86 ± 6,22	0,76 ± 0,72
13	OP(M)	6,08 ± 3,24	66,58 ± 8,81 ^{*b}	32,10 ± 10,13	1,32 ± 2,46
14	OP(M)DX	2,24 ± 0,84 ^{**a}	37,56 ± 8,22 ^{*a,**c}	61,16 ± 8,06 ^{**c}	1,28 ± 0,80 ^{*a}
15	ET(M)	9,06 ± 3,01 ^{**b}	79,54 ± 2,95 ^{**a,b,*c}	20,30 ± 3,10 ^{*a,b}	0,16 ± 0,31
16	ET(M)DX	3,68 ± 1,21 ^{**a,e,*b}	53,5 ± 17,76 ^{*a,**b}	46,06 ± 17,62 ^{*a,b}	0,44 ± 0,24 ^{*d}
17	HE(M)	3,46 ± 2,84	76,36 ± 10,23 ^{*a,**b}	19,96 ± 7,96 ^{*a,b}	3,68 ± 4,99
18	HE(M)DX	3,42 ± 0,87 ^{**a}	47,08 ± 11,15 ^{**g}	52,24 ± 11,33 ^{**g}	0,68 ± 0,26
19	AQ(M)	8,62 ± 2,05 ^{**b,*g}	77,94 ± 6,90 ^{**a,b}	21,92 ± 6,81 ^{*a}	0,16 ± 0,25
20	AQ(M)DX	2,50 ± 0,93 ^{**a,i}	45,04 ± 8,05 ^{**i}	53,20 ± 9,01 ^{**i}	1,80 ± 1,64 ^{*i}
	P-valores	0,000	0,000	0,000	0,046
	P-valores (Total)	0,000	0,000	0,000	0,173

Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP). CN=controle negativo; CP=controle positivo; OP=tratamento com óleo de pequi; ET=tratamento com extrato etanólico; HE=tratamento com extrato hidroetanólico; AQ=tratamento com extrato aquoso; DX=tratamento associado a doxorubicina; F=fêmeas; M=machos. ANOVA (em azul) foi usada para gerar os p-valores de neutrófilos+monócitos (fêmeas, machos e grupo total), enquanto o teste de Kruskal-Wallis (em preto) foi usado para gerar os demais p-valores. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Bonferroni ou Mann-Whitney, sendo a=significativo comparado ao grupo CN; b=significativo comparado ao grupo CP; c=significativo comparado ao grupo OP; d=significativo comparado ao grupo OP-DX; e=significativo comparado ao grupo ET; f=significativo comparado ao grupo ET-DX; g=significativo comparado ao grupo HE; h=significativo comparado ao grupo HE-DX; i=significativo comparado ao grupo AQ. Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) ou altamente significativas (**p<0,01). O símbolo # indica diferenças significativas entre machos e fêmeas para os mesmos tratamentos.

4.3.3.3. Plaquetograma

A avaliação do plaquetograma nas fêmeas tratadas com o óleo de pequi indicou uma redução nas plaquetas, quando comparadas ao controle negativo. Em relação à análise do volume plaquetário médio (VPM), as fêmeas que receberam o tratamento com o extrato hidroetanólico associado a DX apresentaram uma diminuição quando comparadas ao controle negativo. O grupo AQ(F)DX também demonstrou níveis reduzidos de VPM em relação ao CN(F) e ao CP(F). Nos grupos AQ(M) e AQ(M)DX houve uma redução dos valores de VPM comparados ao CN(M). O grupo ET(M) apresentou uma elevação no mesmo parâmetro em

relação ao grupo CN(M). O tratamento com o extrato etanólico concomitante com DX reduziu os níveis de VPM nos machos, quando comparado ao grupo tratado apenas com o extrato. O grupo ET(F) apresentou uma diminuição da amplitude da distribuição de plaquetas (PDW) em relação aos grupos CP(F); no entanto a associação do extrato etanólico a DX elevou o PDW em comparação ao tratamento somente com o extrato (Tabela 12).

Tabela 12 - Resultados do plaquetograma de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 µL/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorubicina (DX) intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia.

Grupo	Tratamento	Plaquetas (x 10 ³ /µL)	VPM (fl)	P-LCR (%)	PDW (fl)
1	CN(F)	1432,83 ± 96,66	6,80 ± 0,23	10,43 ± 1,29	6,97 ± 0,45
2	CP(F)	1362,00 ± 173,27	6,68 ± 0,33	9,43 ± 2,46	6,87 ± 0,20
3	OP(F)	985,80 ± 226,99 ^{*a}	6,66 ± 0,61	10,84 ± 4,95	6,74 ± 0,23
4	OP(F)DX	1239,20 ± 138,38	6,64 ± 0,28	9,00 ± 2,07	6,86 ± 0,24
5	ET(F)	1124,20 ± 206,80	6,60 ± 0,20	9,90 ± 2,15	6,57 ± 0,12 ^{*b}
6	ET(F)DX	1341,80 ± 105,61	6,68 ± 0,27	8,38 ± 2,30	6,96 ± 0,19 ^{*e}
7	HE(F)	1463,60 ± 116,71 ^{*c}	6,50 ± 0,17	8,27 ± 2,11	6,67 ± 0,15
8	HE(F)DX	1227,80 ± 296,21	6,48 ± 0,08 ^{*a,#}	7,88 ± 2,00	6,78 ± 0,26 [#]
9	AQ(F)	1076,60 ± 259,29	6,37 ± 0,55	4,97 ± 3,27	6,47 ± 0,38
10	AQ(F)DX	1215,00 ± 253,56	6,24 ± 0,22 ^{*a,b,f,#}	5,90 ± 1,30	6,88 ± 0,38
P-valores		0,004	0,246	0,040	0,415
11	CN(M)	1522,20 ± 175,87	6,52 ± 0,22	8,04 ± 2,31	6,76 ± 0,15
12	CP(M)	1346,60 ± 186,45	6,46 ± 0,36	8,90 ± 2,81	6,66 ± 0,19
13	OP(M)	1118,40 ± 500,85	6,48 ± 0,19	9,50 ± 0,98	6,63 ± 0,22
14	OP(M)DX	1391,80 ± 116,71	6,70 ± 0,25	9,15 ± 1,75	6,95 ± 0,35
15	ET(M)	1522,60 ± 326,41	6,88 ± 0,28 ^{*a,c}	12,40 ± 3,12	6,60 ± 0,10
16	ET(M)DX	1275,40 ± 189,72	6,46 ± 0,09 ^{*e}	8,18 ± 0,91	6,52 ± 0,31
17	HE(M)	1469,80 ± 98,99	6,28 ± 0,22 ^{*e}	6,65 ± 1,65 ^{**e}	6,50 ± 0,08
18	HE(M)DX	1401,40 ± 207,47	6,38 ± 0,21	7,80 ± 1,25	6,65 ± 0,26
19	AQ(M)	1714,40 ± 196,38 ^{*c}	6,14 ± 0,23 ^{*a,c,**e}	6,74 ± 2,20 ^{**e}	6,24 ± 0,24
20	AQ(M)DX	1284,60 ± 101,33	6,16 ± 0,13 ^{*a,d,f}	6,90 ± 1,07	6,50 ± 0,27
P-valores		0,030	0,003	0,003	0,011
P-valores (Total)		0,000	0,004	0,002	0,016

Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP). CN=controle negativo; CP=controle positivo; OP=tratamento com óleo de pequi; ET=tratamento com extrato etanólico; HE=tratamento com extrato hidroetanólico; AQ=tratamento com extrato aquoso; DX=tratamento associado a doxorubicina; F=fêmeas; M=machos; VPM= volume plaquetário médio; P-LCR= porcentagem de plaquetas gigantes (do inglês, *platelet large cell ratio*); PDW= amplitude da distribuição das plaquetas (do inglês, *platelet distribution width*). ANOVA (em azul) foi usada para gerar os p-valores de plaquetas e P-LCR de fêmeas, de plaquetas, P-LCR e PDW de machos, e de plaquetas e P-LCR do grupo total, enquanto o teste de Kruskal-Wallis (em preto) foi usado para gerar os demais p-valores. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Bonferroni ou Mann-Whitney, sendo a=significativo comparado ao grupo CN; b=significativo comparado ao grupo CP; c=significativo comparado ao grupo OP; d= significativo comparado ao grupo OP-DX; e=significativo comparado ao grupo ET; f=significativo comparado ao grupo ET-DX; g=significativo comparado ao grupo HE; h=significativo comparado ao grupo HE-DX; i=significativo comparado ao grupo AQ. Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) ou altamente significativas (**p<0,01). O símbolo # indica diferenças significativas entre machos e fêmeas para os mesmos tratamentos.

4.3.4. Teste do Micronúcleo e índice de proliferação celular (%EPC)

As frequências de micronúcleos nos eritrócitos normocromáticos (MN-ENC) e policromáticos (MN-EPC) encontrados nos camundongos fêmeas e machos estão na tabela 13.

Tabela 13 – Resultados do teste do micronúcleo em camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 µL/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorubicina (DX) intraperitoneal 48 horas antes da eutanásia.

Grupo	Tratamento	MN-ENC	MN-EPC
1	CN(F)	0,17 ± 0,41 [#]	0,83 ± 1,17 [#]
2	CP(F)	3,80 ± 1,64 ^{**a}	18,40 ± 8,33 ^{**a#}
3	OP(F)	0,20 ± 0,45 ^{**b,#}	0,40 ± 0,55 ^{**b,#}
4	OP(F)DX	1,80 ± 1,79 [#]	9,60 ± 4,98 ^{**a,c#}
5	Et(F)	1,40 ± 1,67 [#]	1,00 ± 0,71 ^{**b,#}
6	Et(F)DX	1,20 ± 0,84 ^{*a,b,#}	14,60 ± 9,97 ^{**a,e,#}
7	Het(F)	0,60 ± 0,55 ^{**b}	0,40 ± 0,55 ^{**b,#}
8	Het(F)DX	2,80 ± 0,84 ^{**a,g,#f}	11,80 ± 8,76 ^{**a,g,#}
9	AQ(F)	0,00 ± 0,00 ^{**b}	0,20 ± 0,45 ^{**b,#}
10	AQ(F)DX	1,80 ± 1,92 ^{*a,i}	18,60 ± 8,56 ^{**a,i,#}
P-valores		0,001	0,000
11	CN(M)	1,60 ± 2,30	1,20 ± 1,64
12	CP(M)	1,80 ± 1,30	15,00 ± 8,57 ^{*a}
13	OP(M)	0,60 ± 0,89	0,40 ± 0,89 ^{**b}
14	OP(M)DX	0,60 ± 0,55	10,60 ± 7,99 ^{*a,**c}
15	Et(M)	1,60 ± 0,89	2,20 ± 2,28 ^{*b}
16	Et(M)DX	1,80 ± 1,10	17,00 ± 6,21 ^{**a,e}
17	Het(M)	0,20 ± 0,45 ^{*b,e}	0,20 ± 0,45 ^{**b}
18	Het(M)DX	9,40 ± 7,09 ^{*a,b,f,**g}	28,20 ± 14,57 ^{**a,g}
19	AQ(M)	0,20 ± 0,45 ^{*b,e}	0,40 ± 0,55 ^{**b}
20	AQ(M)DX	2,40 ± 1,95 ^{*h,i}	16,60 ± 3,58 ^{**a,i}
P-valores		0,003	0,000
P-valores (Total)		0,000	0,000

Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP). CN= controle negativo; CP=controle positivo; OP = tratamento com óleo de pequi; ET = tratamento com extrato etanólico; HE = tratamento com extrato hidroetanólico; AQ=tratamento com extrato aquoso; F=fêmeas; M=machos. O teste de Kruskal-Wallis foi usado para gerar os p-valores. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas Mann-Whitney, sendo a=significativo comparado ao grupo CN; b=significativo comparado ao grupo CP; c=significativo comparado ao grupo OP; d=significativo comparado ao grupo OP-DX; e=significativo comparado ao grupo ET; f=significativo comparado ao grupo ET-DX; g=significativo comparado ao grupo HE; h=significativo comparado ao grupo HE-DX; i=significativo comparado ao grupo AQ. Os asteriscos indicam diferenças significativas (*p<0,05) ou altamente significativas (**p<0,01). O símbolo # indica diferenças significativas entre machos e fêmeas para os mesmos tratamentos.

A comparação da frequência de micronúcleos nos MN-ENC entre os sexos demonstrou uma frequência menor de MN no CN(F) em relação ao CN(M); no entanto, na comparação entre os controles positivos, não houve diferenças estatisticamente significativas. A frequência de MN-EPC, comparadas entre os sexos, apresentou-se reduzida nas fêmeas;

porém, comparando-se os controles positivos, ocorreu o inverso, havendo um aumento da frequência de MN no CP(F) em relação ao CP(M).

Em relação à frequência de MN-ENC, as fêmeas apresentaram maior frequência no controle positivo em relação ao controle negativo; contudo, nos machos, não houve diferenças significativas entre os controles. Os grupos tratados com o óleo (OP), o extrato hidroetanólico (HE) e o extrato aquoso (AQ), nas fêmeas, apresentaram frequências de MN-ENC reduzidas em relação ao CP(F). Nos machos, o mesmo ocorreu com os grupos HE(M) e AQ(M) em relação ao CP(M). O tratamento com os extratos HE e AQ associado à DX promoveu o aumento da frequência, quando comparado ao CN(F) e aos tratados apenas com esses extratos, nas fêmeas. Comparando-se o tratamento com o extrato ET concomitante com a DX com o CN(F), associação promoveu o aumento da frequência MN-ENC; porém houve a diminuição quando comparada ao CP(F). O grupo HE(M)DX apresentou frequências mais elevadas em relação aos controles e ao tratamento apenas com o extrato HE. A frequência de MN-ENC no grupo AQ(M)DX foi significativamente maior quando comparada ao grupo AQ(M).

Avaliando-se a frequência de MN-EPC, a comparação entre os controles negativo e positivo, em ambos os sexos, demonstrou diferenças estatisticamente significantes, apontando um aumento na frequência de MN no grupo controle positivo. Para os demais tratamentos, os grupos tratados apenas com o OP ou os extratos apresentou frequências reduzidas de MN-EPC em relação ao controle positivo. Os tratamentos associados a DX promoveram o aumento da frequência em relação ao controle negativo e aos tratamentos apenas com o OP ou com os extratos correspondentes, tanto em fêmeas quanto em machos.

A porcentagem de eritrócitos policromáticos (%EPC) ou índice de proliferação celular foi utilizada como marcador de citotoxicidade na medula óssea de camundongos (HOLDEN et al, 1997). O gráfico com os dados correspondentes à avaliação desse parâmetro está representado na figura 15.

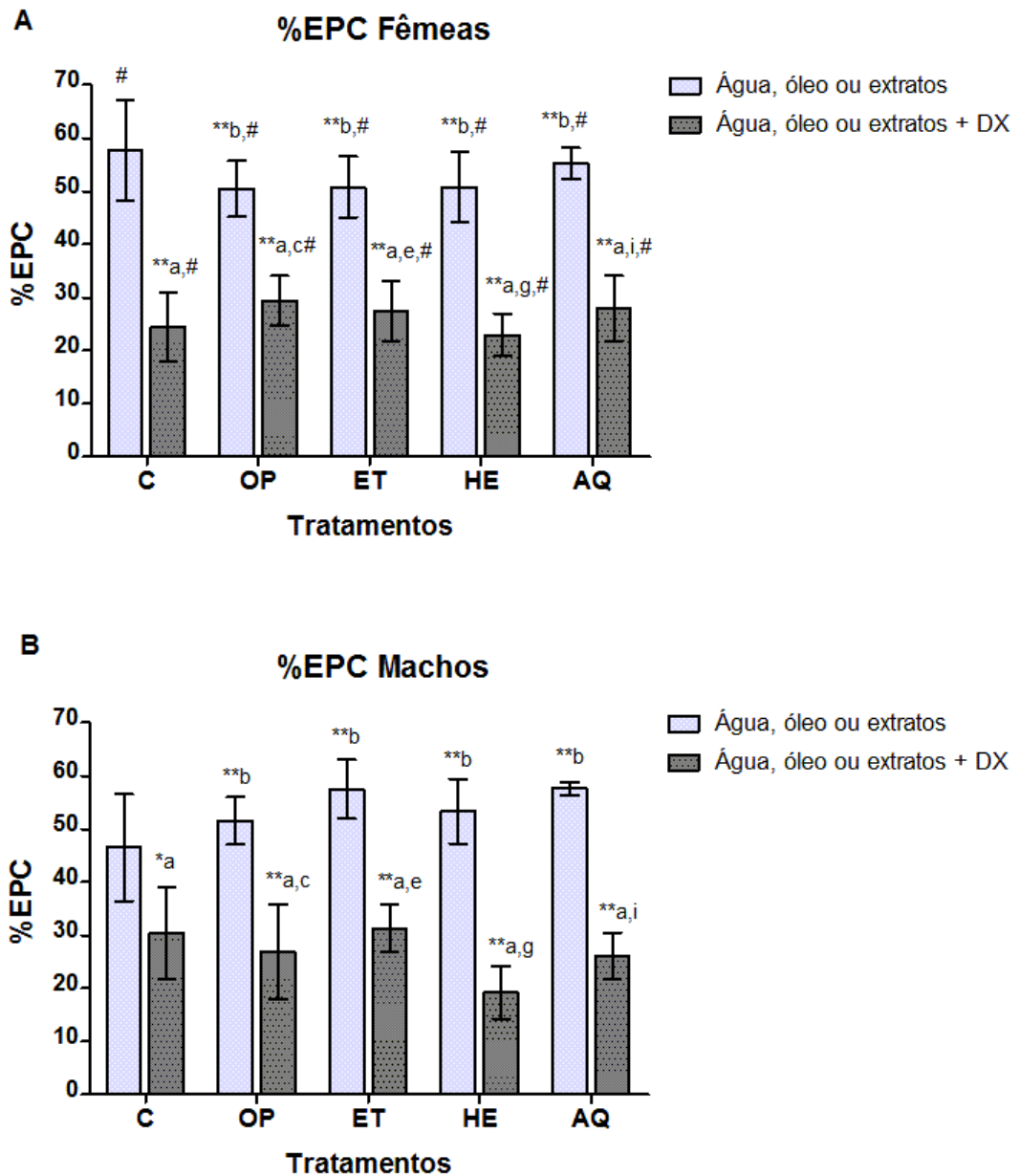


Figura 15: Porcentagem de eritrócitos policromáticos (%EPC) de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 mg/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorrubicina (DX) intraperitoneal, 48 horas antes da eutanásia A) fêmeas e B) machos. Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP). C=controles (água ou água+DX); OP=tratamento com óleo de pequi; ET=tratamento com extrato etanólico; HE=tratamento com extrato hidroetanólico; AQ=tratamento com extrato aquoso; DX=doxorrubicina. ANOVA foi usada para gerar o p-valor de %EPC de machos, enquanto o teste de Kruskal-Wallis foi usado para gerar os demais p-valoros. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste Bonferroni (%EPC de machos) ou de Mann-Whitney (demais variáveis), sendo a=significativo comparado ao grupo controle negativo (água); b=significativo comparado ao grupo controle positivo (água+DX); c=significativo comparado ao grupo OP; d=significativo comparado ao grupo OP-DX; e=significativo comparado ao grupo ET; f=significativo comparado ao grupo ET-DX; g=significativo comparado ao grupo HE; h=significativo comparado ao grupo HE-DX; i= significativo comparado ao grupo AQ. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* $p < 0,05$) ou altamente significativas (** $p < 0,01$). O símbolo # indica diferenças significativas entre machos e fêmeas para os mesmos tratamentos.

Comparando-se a %EPC entre os sexos, o CN(F) apresentou valores mais elevados que o CN(M); porém o inverso ocorreu em relação aos controles positivos, a %EPC no CP(F) foi inferior ao CP(M). Em ambos os sexos houve um decréscimo significativo da %EPC nos controles positivos em relação aos controles negativos. Para todos os tratamentos, tanto em fêmeas quanto em machos, ocorreu um aumento na %EPC dos grupos tratados em relação ao controle positivo. Os tratamentos com o OP ou com os extratos associados a DX promoveu redução significativa da %EPC, quando comparados ao controle negativo e aos grupos tratados apenas com o OP ou com os extratos.

4.3.5. Teste do Cometa

Os resultados obtidos no do teste do cometa se encontram na figura 16. Os dados estão representados como médias e desvios padrão da porcentagem de dano total (% dano total), calculado a partir do índice dano (ID).

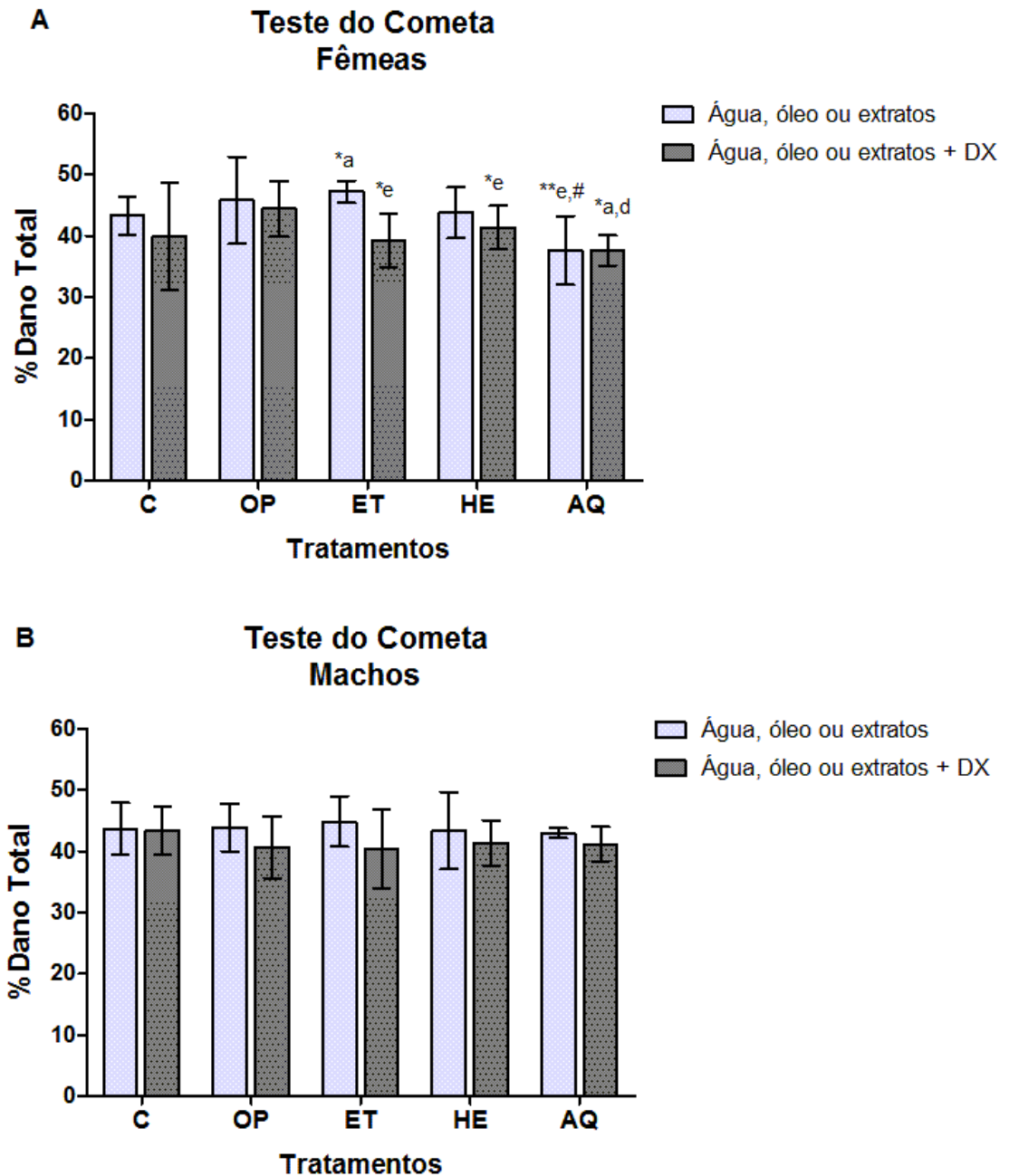


Figura 16: Resultados do Teste do Cometa de camundongos Swiss após o tratamento com óleo ou extratos de pequi (30 μ L/animal/dia) administrados oralmente durante 10 dias consecutivos. Os controles negativos receberam água filtrada administrada da mesma forma e os controles positivos 40 mg/kg doxorrubicina (DX) intraperitoneal, 48 horas antes da eutanásia A) fêmeas e B) machos. Os dados correspondem à média e ao desvio padrão (DP). C=controles (água ou água+DX); OP=tratamento com óleo de pequi; ET=tratamento com extrato etanólico; HE=tratamento com extrato hidroetanólico; AQ=tratamento com extrato aquoso; DX=doxorrubicina. ANOVA foi usada para gerar os p-valores de machos, enquanto o teste de Kruskal-Wallis foi usado para gerar os p-valores de fêmeas. As letras minúsculas indicam diferenças significativas nas comparações 2-a-2 detectadas pelo teste de Bonferroni (% de danos totais de machos) ou de Mann-Whitney (% de danos totais de fêmeas), sendo sendo a=significativo comparado ao grupo controle negativo (água); b=significativo comparado ao grupo controle positivo (água+DX); c=significativo comparado ao grupo OP; d=significativo comparado ao grupo OP-DX; e=significativo comparado ao grupo ET. Os asteriscos indicam diferenças significativas (* p <0,05) ou altamente significativas (** p <0,01). O símbolo # indica diferenças significativas entre machos e fêmeas para os mesmos tratamentos.

Nas fêmeas, houve um aumento significativo na % dano total nos grupos ET(F) e AQ(F)DX, quando comparados ao CN(F). O grupo ET(F) também apresentou % dano total mais elevada em relação ao grupo ET(F)DX. Os machos não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

5. DISCUSSÃO

5.1. Característica fitoquímicas do óleo e dos extratos da polpa do pequi

O fruto do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) é alvo extenso de pesquisas relacionadas às suas propriedades antioxidantes, dentre outras características nutricionais e etnofarmacológicas (PAULA-JU et al., 2006; MIRANDA-VILELA et al., 2009a). A radiação solar, bastante intensa no bioma cerrado, e a composição basicamente lipídica da polpa e da amêndoa do pequi favorecem a síntese de metabólitos secundários na planta relacionadas à proteção contra os processos oxidativos e a peroxidação lipídica (VERA et al., 2005; LIMA et al., 2007).

Os carotenoides e os compostos fenólicos são metabólitos secundários encontrados na polpa do pequi que conferem ao fruto um elevado potencial antioxidante (ROESLER et al., 2007). No presente estudo, os carotenoides totais foram encontrados apenas no óleo e no extrato etanólico da polpa do pequi. O teor de carotenoides no extrato etanólico foi bastante superior ao do óleo, sugerindo a influência do método de extração e a polaridade do solvente utilizado, visto que nos extratos hidroetanólico e aquoso o composto não foi encontrado, como discutido a seguir.

As características químicas e estruturais dos carotenoides os tornam insolúveis em água, sendo extraídos de forma satisfatória com etanol. Apesar dos carotenoides zeaxantina e luteína, que apresentam características hidrofóbicas, serem encontrados na polpa do pequi (AZEVEDO-MELEIRO E RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LIMA et al. 2007), o método utilizado no estudo para determinar o teor de carotenoides totais não detectou a presença de carotenoides nos extratos hidroetanólico e aquoso.

De acordo com Lima et al. (2007) o teor de carotenoides totais na polpa de pequi foi $7,25 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, enquanto Cardoso et al. (2013) determinou que a concentração foi de $8,11 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, não havendo uma variação acentuada entre as concentrações estabelecidas pelos autores. No entanto, segundo Ribeiro (2011), a concentração de carotenoides pode variar de acordo com o local de coleta do pequi e os valores encontrados pelo autor variaram de 3,7 a $20 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, dependendo da proveniência do fruto. Convertendo-se para a mesma unidade utilizada pelos autores citados acima, a concentração de carotenoides no óleo foi de $27 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$ e no extrato etanólico, de $172,17 \text{ mg} \cdot 100\text{g}^{-1}$, valores superiores aos encontrados na literatura, principalmente no extrato etanólico. A discrepância entre os valores de carotenoides totais encontrados em outros trabalhos e no presente estudo pode ser devido à forma de

extração e preparação das amostras para a análise, às características geográficas (clima e solo) do local de coleta que podem influenciar o conteúdo de carotenoides nos frutos do pequi (RIBEIRO, 2011) e também decorrente de diferenças no estágio de maturação dos frutos no momento da colheita (OLIVEIRA et al., 2006). Nos trabalhos anteriormente expostos, a determinação do teor de carotenoides foi realizada na polpa do pequi como um todo, enquanto no estudo em questão as amostras foram concentradas, elevando-se o teor dos constituintes solúveis nos solventes utilizados.

De acordo com Ribeiro et al. (2010), a extração etanólica de carotenoides totais da polpa do buriti (*Mauritia flexuosa* L.), fruto rico em carotenoides, foi bastante satisfatória, e demonstra a eficiência do método empregado para a extração destes compostos. No estudo de Ribeiro et al. (2010), o rendimento da extração de carotenoides com etanol foi 40% maior que a extração com o solvente orgânico tipicamente utilizado na indústria para a obtenção de óleos vegetais, o n-hexano. Em relação ao óleo da polpa de pequi obtido por extração mecânica, Ribeiro et al. (2012) verificaram que o processo é o menos vantajoso para a obtenção do óleo, pois o método apresenta a redução mais acentuada nos níveis de carotenoides totais ao longo do tempo, provavelmente devido à maior taxa de degradação do óleo durante a extração e nossos resultados corroboram esta afirmação.

O teor de compostos fenólicos totais encontrados na polpa do pequi, de acordo com Lima et al. (2007), foi de 209 mg.100g⁻¹; no entanto, os valores podem variar de 177 a 334 mg.100g⁻¹ conforme a região de coleta do fruto (RIBEIRO, 2011). No presente estudo, os compostos fenólicos foram detectados no extrato etanólico, hidroetanólico e aquoso. A maior concentração foi encontrada no extrato aquoso (7590 mg.100g⁻¹), seguido pelo extrato hidroetanólico (7090 mg.100g⁻¹). No extrato etanólico, a concentração foi menor em relação aos outros extratos (2006 mg.100g⁻¹). A maior concentração de compostos fenólicos totais nos extratos estudados se deve ao mesmo motivo anteriormente esclarecido para o aumento no teor de carotenoides totais: os extratos brutos, como os obtidos no estudo, são preparações concentradas e, portanto, contém quantidades mais elevadas de substâncias com polaridade semelhante a do solvente utilizado para a preparação da solução extrativa.

A variedade estrutural dos compostos fenólicos e a grande possibilidade de substituições na molécula ampliam o espectro de solubilidade desses compostos, tornando-os solúveis em meio aquoso ou lipídico (CERQUEIRA, 2007). Os compostos conjugados sob a forma de ésteres e amidas são solúveis em água, enquanto os ácidos fenólicos são extraídos de forma eficaz em soluções aquosas-orgânicas (MIRA et al., 2008).

O ensaio do DPPH (2,2-difenil-1-picril hidrazil) é amplamente aplicado para estimar a atividade antioxidante de diversas substâncias, sobretudo as de origem vegetal (MOON E SHIBAMOTO, 2009). O valor de EC₅₀ ou “concentração eficiente” define a concentração do substrato que induz a 50% de inibição da atividade do radical livre DPPH. Portanto, quanto menor o valor de EC₅₀, maior o potencial antioxidante apresentado pela substância no ensaio de DPPH (MOLYNEUX, 2003). O óleo e os extratos da polpa do pequi apresentaram atividade antioxidante quando submetidos ao ensaio do DPPH, porém com eficiência inferior ao antioxidante BHT (EC₅₀ de 6 µg.mL⁻¹) e a vitamina C (EC₅₀ de 12 µg.mL⁻¹). O valor de EC₅₀ para os extratos não variou consideravelmente, sendo o extrato hidroetanólico o mais potente (7,53 mg.mL⁻¹), seguido do extrato etanólico (8 mg.mL⁻¹) e do extrato aquoso (8,57 mg.mL⁻¹). O potencial antioxidante do óleo da polpa do pequi foi o mais reduzido entre as amostras estudadas, com EC₅₀ de 26,26 mg.mL⁻¹.

Comparando-se a EC₅₀ obtida com o óleo e os extratos da polpa do pequi com outros estudos, os valores encontrados foram consideravelmente superiores no óleo, indicando um potencial antioxidante reduzido. Porém, entre os autores, a capacidade dos extratos da polpa do pequi de sequestrar radicais livres é bastante variada. Os valores de EC₅₀ dos extratos etanólico, aquoso e etéreo obtidos por Ribeiro (2011) foram, respectivamente, 196 µg.mL⁻¹, 193 µg.mL⁻¹ e 196 µg.mL⁻¹. De acordo com Lima (2008) o valor de EC₅₀ do extrato aquoso foi de 260,37 µg.mL⁻¹, enquanto dos extratos etanólico e etéreo foram mais elevados: 820,7 µg.mL⁻¹ e 4.580 µg.mL⁻¹, respectivamente. Para Roesler et al. (2007) os valores EC₅₀ dos extratos etanólico e aquoso da polpa associada a semente do pequi foram 298,75 µg.mL⁻¹ e 534,43 µg.mL⁻¹, respectivamente.

Apesar da variação dos valores de EC₅₀ previamente obtidos para os extratos da polpa do pequi, o potencial antioxidante do óleo e dos extratos avaliados foi inferior aos encontrados por outros autores. A diferença pode ser atribuída ao método de extração e a procedência do fruto utilizado no preparo das amostras. De acordo com Ribeiro (2011), os frutos provenientes de diversas regiões apresentam divergências nos parâmetros físicos e químicos, inclusive nos valores de EC₅₀; porém, a diferença entre o potencial antioxidante das amostras avaliadas no presente estudo comparadas aos estudos prévios, com a polpa do pequi está além do esperado para a variação inter-regional.

A avaliação do potencial antioxidante de extratos vegetais *in vitro* deve ser realizada com vários testes antioxidantes em paralelo, pois os diferentes métodos podem induzir a resultados distintos dependendo da afinidade do método pelos compostos analisados. O ensaio do DPPH é amplamente utilizado para a avaliação da capacidade antioxidante de extratos

vegetais; contudo, em estudo conduzido por Muller et al. (2011), os carotenoides isolados não demonstraram potencial redutor em relação ao radical livre DPPH. Os carotenoides são amplamente identificados na polpa do pequi e são responsáveis, em grande parte, pela atividade antioxidante do fruto (AZEVEDO-MELEIRO E RODRIGUEZ-AMAYA, 2004; LIMA et al. 2007). Considerando-se os resultados obtidos no ensaio do DPPH e a ineficiência dos carotenoides em reduzi-los, o potencial antioxidante do óleo e do extrato etanólico da polpa de pequi podem ter sido subestimados, haja vista o teor de carotenoides nessas amostras. Para tanto, os métodos FRAP (poder antioxidante de redução do ferro), α TEAC (capacidade antioxidante equivalente ao α -tocoferol), TRAP (parâmetro antioxidante) e ORAC (capacidade de absorbância do radical oxigênio) seriam os mais indicados para a avaliação de extratos que contêm carotenoides (MÜLLER et al., 2011).

5.2. Ensaios biológicos

O ensaio TBARS é um método amplamente difundido para avaliação indireta da capacidade antioxidante de extratos vegetais *in vivo* (BARATTA et al. 1998; KONTA et al, 2013). Neste estudo, os camundongos foram tratados com o óleo ou com os extratos da polpa do pequi para avaliar o potencial pró-oxidante do tratamento por meio da formação de malonaldeído (MDA), produto da peroxidação lipídica induzida pelo estresse oxidativo. Adicionalmente, camundongos foram tratados com o óleo ou com os extratos concomitantemente com o quimioterápico doxorrubicina (DX) para avaliar a capacidade protetora do tratamento em relação aos danos oxidativos promovidos pela DX.

A DX é uma antraciclina e, como os outros membros dessa classe, capaz de induzir o estresse oxidativo. Embora os principais efeitos anti-cancerígenos das antraciclinas decorram da inibição da topoisomerase II e da sua habilidade de modificar as helicases para dissociar o DNA duplex em DNA de cadeia simples, impedindo assim a replicação do DNA (DANESI et al., 2002), o dano oxidativo aos lipídios da membrana e a outros componentes celulares é o principal fator responsável pela toxicidade da DX (FADILLIOGLU et al, 2004). Na estrutura química da DX há um grupamento quinona localizado no anel de tetraciclina que participa dos processos de oxirredução. A redução de um elétron nesse grupamento pela NADPH oxidorredutase gera o radical livre semiquinona. Portanto, a DX pode reagir com as flavoproteínas redutases, como a citocromo P450 redutase e a NADPH quinino-oxidorredutase, para gerar radicais superóxido na presença de oxigênio molecular. Além disso, a DX pode induzir a produção de espécies reativas de oxigênio por meio da quebra do

ferro intracelular. A reação de Fenton promovida pela associação pode gerar radicais hidroxila altamente reativos (FADILLIOGLU et al., 2004; TRACHOOTHAM et al., 2009).

A suplementação com carotenoides e compostos fenólicos, além de outros compostos antioxidantes, tem-se mostrado eficaz na redução da peroxidação lipídica, danos oxidativos ao DNA e cardiotoxicidade induzida pela DX (CONKLIN, 2004; ANJOS FERREIRA et al., 2007; FERREIRA et al., 2007; KAISEROVÁ et al., 2007). No entanto, no presente estudo não foi possível demonstrar tal potencial nos tratamentos com o óleo e os extratos da polpa do pequi por meio da inibição da peroxidação lipídica acessado pelo ensaio do TBARS, devido ao elevado grau de hemólise nas amostras de plasma dos camundongos. A reação colorimétrica entre o MDA e o ácido tiobarbitúrico (ATB) no teste do TBARS produz um pigmento rosa com absorvância nos comprimentos de onda de 530 a 540 nm (ESTERBAUER E CHEESEMAN, 1990). Portanto, outras substâncias que absorvem a luz no mesmo comprimento de onda do complexo MDA-ATB podem interferir nos resultados. A hemólise libera substâncias no plasma, como a hemoglobina que interfere diretamente na absorvância do MDA-ATB e, conseqüentemente, nos resultados da concentração de MDA, superestimando o grau de peroxidação lipídica (PYLES et al., 1993; DANE et al., 2008).

Os xenobióticos podem induzir lesões oxidativas nos eritrócitos através da potencialização das reações de oxirredução intrínsecas da célula e suprimindo os mecanismos antioxidantes enzimáticos. Os principais antioxidantes endógenos encontrados nos eritrócitos para prevenir os danos promovidos pelas espécies reativas de oxigênio são: glutathione (GSH), superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutathione peroxidase (GPx) (KURATA et al., 1993). A interação entre o xenobiótico e a hemoglobina induz a formação de radicais livres que desnaturam proteínas e oxidam lipídios da membrana eritrocitária (BLOOM E BRANDT, 2008).

Analisando-se o eritrograma dos camundongos tratados com o óleo ou os extratos da polpa do pequi vê-se que não houve alterações consideráveis nos parâmetros que indicassem o potencial hematotóxico dos tratamentos, exceto pelos valores de eritrócitos, hemoglobina (HGB) e hemoglobina corpuscular média (HCM) nos machos tratados com o extrato aquoso, que foram inferiores aos valores do grupo controle negativo, sendo os valores de HGB também inferiores aos valores de referência reportados na literatura para camundongos (VIANA, 2007). O decréscimo desses parâmetros hematológicos observado no tratamento com o extrato aquoso pode ser atribuído às saponinas hemolíticas presentes no extrato (PRICE et al, 1987; AHN et al., 2007; MIRANDA-VILELA et al. 2009a). Nas fêmeas, o tratamento apenas com o óleo induziu ao aumento do volume corpuscular médio (VCM) e da

hemoglobina corpuscular média (HCM), enquanto diminuiu a amplitude de distribuição dos eritrócitos (RDW). O tratamento com o extrato aquoso nas fêmeas também apresentou uma diminuição do RDW. De acordo com Monteiro (2010), os valores mais baixos de RDW representam uma população mais homogênea de hemácia, indicando normalidade. Nos machos os valores da hemoglobina corpuscular média (HCM) camundongos tratados com o óleo ou os extratos foram reduzidos em relação ao controle negativo, assim como a concentração de hemoglobina corpuscular média (CHCM) dos tratados com o óleo e com o extrato hidroetanólico; no entanto, os valores encontrados estão na faixa de referência ou normalidade para camundongos Swiss machos (CASTELLO BRANCO et al., 2011). O volume corpuscular médio (VCM) dos camundongos tratados com óleo foi inferior em relação ao controle negativo, porém os outros parâmetros não corroboram a ocorrência de eventos hemolíticos. Em geral, os valores de VCM de fêmeas e machos no estudo se encontram abaixo da média para a linhagem de camundongos Swiss (CASTELLO BRANCO et al., 2011).

A produção de radicais livres e o estresse oxidativo está intimamente envolvido no mecanismo de ação e nos efeitos deletérios da DX (GRANADOS-PRINCIPAL et al., 2010). Devido à hematotoxicidade promovida pelos radicais livres, o estresse oxidativo pode induzir ao declínio dos parâmetros do eritrograma (eritrócitos, hemoglobina (HGB), hematócrito (HCT), volume corpuscular médio (VCM) e hemoglobina corpuscular média (HCM), o qual pode ser correlacionado com a diminuição dos eritrócitos decorrentes da hemólise (SANTHOSH et al., 2013).

O tratamento com o óleo e os extratos da polpa do pequi e a DX não demonstraram uma redução da hematotoxicidade causada pela DX. Contudo, apesar das amostras da polpa do pequi possuírem substâncias antioxidantes na composição e apresentarem capacidade antioxidante *in vitro*, o óleo e os extratos associados a DX induziram a redução nos níveis de eritrócitos, HGB, HCM e VCM; sobretudo os extratos etanólico e hidroetanólico. A presença de metais de transição, como o ferro (Fe), o cobre (Cu) e o zinco (Zn) em concentrações elevadas e a alta dose de DX podem ter influenciado a indução de hematotoxicidade (SMITH et al., 2007). A concentração de Fe no óleo da polpa de pequi foi aproximadamente dez vezes mais elevada que o descrito para a polpa *in natura* e a concentração de Cu no extrato hidroetanólico, em torno de cinco vezes maior (MARIANO-DA-SILVA, 2009). O complexo DX-Fe pode se ligar a membrana dos eritrócitos, promover a decomposição de ácidos graxos poli-insaturados e, conseqüentemente, a hemólise (MYERS et al., 1982).

A terapia antioxidante está associada à capacidade de potencializar o sistema imunológico. Os compostos e nutrientes antioxidantes atuam como imunomoduladores através da redução da peroxidação lipídica e da produção de prostaglandina E₂ nas células imunológicas. Os peróxidos derivados da oxidação de ácidos graxos poli-insaturados podem danificar as membranas celulares das células do sistema imunológico, induzindo a imunossupressão. Além disso, a síntese da prostaglandina E₂, envolvida nos eventos inflamatórios e oxidativos, é precedida pela peroxidação do ácido araquidônico (CORWIN E SHLOSS, 1980; JENG et al., 1996; HAYEK et al., 1999).

O tratamento com o óleo e os extratos da polpa do pequi não induziu a imunotoxicidade através da redução dos parâmetros imunológicos. Houve um aumento dos leucócitos totais nos camundongos tratados com o extrato etanólico e nos linfócitos dos camundongos machos tratados com os extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso. Porém os mesmos extratos também induziram a redução dos neutrófilos, que aparecem aumentados durante os processos inflamatórios e infecciosos (KAMINSKI et al., 2008) e todos os valores encontrados estavam na faixa de referência para camundongos (VIERA, 2007; CASTELLO BRANCO et al., 2011). Esses dados corroboram estudos prévios com atletas que indicam o potencial anti-inflamatório do óleo de pequi (MIRANDA-VILELA et al., 2009b).

A leucopenia induzida pela administração de DX não foi inibida pela associação com o óleo e os extratos de polpa de pequi. A toxicidade promovida pelos agentes antineoplásicos nas células sanguíneas é uma das principais e mais perigosas reações adversas desses compostos, sobretudo a neutropenia, pois pode aumentar a susceptibilidade do organismo a infecções (SHENG et al., 2000). No estudo em questão, não houve a ocorrência de neutropenia nos camundongos tratados com a associação; contrariamente, ocorreu um aumento da porcentagem de neutrófilos em relação ao controle negativo e ao tratamento apenas as com amostras da polpa de pequi.

O tratamento com a DX está relacionado a uma intensa mielossupressão (redução da produção de células hematopoiéticas pela medula óssea) (BALLY et al. 1990; SHENG et al., 2000) . A redução da contagem de células brancas no sangue periférico promovido pela DX pode ser atribuída à supressão da hematopoese na medula óssea e/ou a destruição celular pela peroxidação dos lipídeos de membrana induzida pela DX no organismo (GUTTERID, 1984; OCTAVIA et al., 2012). No presente estudo, a mielotoxicidade ou citotoxicidade na medula óssea foi avaliada por meio da porcentagem de eritrócitos policromáticos (%EPC). O tratamento com o óleo ou com os extratos de pequi, contudo, não promoveu a proteção contra a supressão medular causada pelo quimioterápico.

O teste do cometa e o ensaio do micronúcleo foram utilizados para avaliar o potencial genotóxico e mutagênico do óleo e dos extratos da polpa de pequi (SCHMID, 1975; SINGH et al., 1988). Os tratamentos apenas com o óleo e com os extratos hidroetanólico e aquoso não apresentaram efeitos genotóxicos ou mutagênicos. No entanto, analisando-se os resultados do teste do cometa, o tratamento com o extrato etanólico nas fêmeas promoveu aumento no índice de danos ao DNA (%ID). Apesar do efeito genotóxico, o extrato não demonstrou efeito mutagênico, avaliado através do teste do micronúcleo. O teste do cometa detecta lesões causadas por fragmentação e/ou modificações no DNA, como os sítios abásicos; porém, os danos no DNA detectados pelo teste do cometa podem ser reparados corretamente sem resultar em alterações genéticas permanentes (BRENDLER-SCHWAAB et al., 2005). Resultados semelhantes foram encontrados por Almeida et al. (2013) no tratamento com o extrato etanólico da polpa do pequiá (*Caryocar villosum*), no qual o extrato induziu a genotoxicidade no fígado, no coração e nos rins, avaliado pelo teste do cometa, porém não demonstrou efeitos mutagênicos através do teste do micronúcleo nos eritrócitos da medula óssea.

A associação entre o óleo ou os extratos da polpa de pequi e a DX não promoveu genotoxicidade, de acordo com o teste do cometa, apesar do potencial genotóxico da DX demonstrado por outros autores com o mesmo ensaio (ANDERSON et al., 1997; ZHANG et al., 2004). O efeito observado no presente estudo com a DX e as amostras de pequi pode ser explicado pela capacidade da DX em induzir apoptose (GARTEL E TYNER, 2000).

Em relação à avaliação da apoptose no teste do cometa, Collins (2004) afirma que apesar de alguns pesquisadores se referirem à representação do nucleóide com praticamente a totalidade do DNA fragmentado na cauda do cometa como células apoptóticas, esses nucleóides não podem ser descritos de tal maneira. De acordo com o autor, a apoptose é irreversível e foi demonstrado que esses nucleóides com extrema fragmentação podem ser reparados (COLLINS et al., 1995). Além disso, a apoptose é caracterizada pela fragmentação do DNA ao tamanho de oligômeros do nucleossomo e esses fragmentos diminutos do DNA certamente tendem a desaparecer durante a lise e a eletroforese (COLLINS, 2004).

Ademais, Chaucroun et al. (2001) demonstram a falta de especificidade da análise de células apoptóticas pelo teste do cometa. Os autores utilizaram marcação específica para células apoptóticas e concluíram que no estágio inicial de apoptose os nucleóides são semelhantes aos cometas de classe 1, ou seja, apresentam dano moderado. Tal afirmação auxilia a compreensão dos achados no presente estudo, pois a apoptose induzida pelo tratamento foi avaliada, de forma inespecífica, como dano moderado pelo teste do cometa,

subestimando a toxicidade da doxorubicina e da doxorubicina associada ao óleo ou aos extratos da polpa do pequi.

Embora o teste do cometa não tenha demonstrado diferenças entre o controle negativo e os tratamentos com a DX e as amostras da polpa do pequi, o ensaio do micronúcleo indicou o aumento da frequência de micronúcleos nos eritrócitos da medula óssea, principalmente nos policromáticos. A administração da DX concomitante com o óleo ou os extratos demonstrou o efeito mutagênico da associação quando comparada ao controle negativo, porém não houve diferenças em relação ao tratamento apenas com a DX. Os achados indicam que o óleo e os extratos de pequi, apesar da capacidade antioxidante *in vitro*, não foram capazes de inibir o efeito mutagênico promovido pela DX. Os resultados do controle negativo corroboram com o *Guideline ICH S2A* (1996) o qual descreve que os machos são mais susceptíveis à indução de micronúcleo. Entretanto, os tratamentos com altas doses de DX induziram efeitos mutagênicos quantitativamente semelhantes em ambos os sexos, sendo machos e fêmeas igualmente susceptíveis.

A incapacidade do óleo e dos extratos da polpa do pequi de inibir os efeitos mutagênicos da DX pode ser relacionada à composição de metais de transição nas amostras. A DX interage com o íon férrico (Fe^{3+}) formando um complexo que sofre uma auto-redução a íon ferroso (Fe^{2+}) gerando o radical livre da DX, a semiquinona. Esse potente radical induz danos ao DNA e a peroxidação lipídica (KOSTORYZ E YOURTEE, 2001; MIRANDA et al., 2003; XU et al., 2005) Além do ferro (Fe), outros metais, como o cobre (Cu), podem iniciar a produção de radicais livres por meio da redução das porções *p*-quinona e *p*-hidroquinona da DX e, conseqüentemente, a formação da semiquinona (MIZUTANI et al, 2003).

Os nutracêuticos, fitoterápicos e suplementos alimentares são potentes adjuvantes na quimioterapia, tanto em relação ao mecanismo antitumoral quanto a prevenção dos efeitos deletérios decorrentes do tratamento (SALDANHA E TOLLEFSBOL, 2012). No entanto, os extratos vegetais possuem atividades farmacológicas e, portanto, podem interagir com outras substâncias incluindo outras plantas medicinais e medicamentos alopáticos (BUSH et al., 2007). Baseando-se no fato, apesar dos efeitos positivos dos nutracêuticos, é crucial o estudo das potenciais interações medicamentosas promovidas pela terapia associada.

6. CONCLUSÕES

1. Os carotenoides totais foram detectados no óleo e no extrato etanólico, enquanto os compostos fenólicos foram detectados nos extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso da polpa do pequi.
2. O óleo e os extratos apresentaram potencial de antioxidante *in vitro*, sendo os extratos mais eficazes que o óleo.
3. O tratamento com o extrato aquoso nos camundongos machos apresentou um potencial hemolítico, provavelmente devido à composição de saponinas hemolíticas no extrato. Entretanto, o tratamento com o óleo e os extratos etanólico e hidroetanólico não induziram alterações hematológicas relevantes.
4. O tratamento com o extrato etanólico nas fêmeas apresentou efeito genotóxico, porém não mutagênico, sugerindo a reversibilidade das lesões do DNA. O óleo e os extratos etanólico, hidroetanólico e aquoso da polpa do pequi não demonstraram potencial genotóxico ou mutagênico.
5. As associações entre a doxorrubicina e o óleo ou os extratos da polpa de pequi foram mutagênicas, citotóxicas, hemolíticas e imunossupressoras nas concentrações administradas, demonstrando a incapacidade das amostras da polpa do pequi em inibir os danos oxidativo promovidos pelo tratamento com a doxorrubicina, possivelmente devido à interação entre os metais de transição encontrados no óleo e nos extratos da polpa do pequi e a doxorrubicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, B.Z. et al. Inhibitory effect of bupleuri radix saponins on adhesion of some solid tumor cells and relation to hemolytic action: screening of 232 herbal drugs for anti-cell adhesion. **Planta medica**, v. 64, n. 03, p. 220-224, 2007.
- ALMEIDA, S. P.; SILVA, J. A. **Piqui e Buriti: importância alimentar para a população dos cerrados**. Planaltina: Embrapa-CPAC, 1994. p. 38
- ALMEIDA, S. P.; PROENÇA, C. E. B.; SANO, S. M.; RIBEIRO, J. F. Cerrado: espécies úteis. Planaltina, DF: Embrapa-CPAC, 1998. 464 p.
- ALMEIDA, M. R. et al. In Vivo Genotoxicity and Oxidative Stress Evaluation of an Ethanolic Extract from Piquiá (*Caryocar villosum*) Pulp. **Journal of medicinal food**, 2013.
- ANDERSON, D.; YU, T.W.; BROWNE, M. A. The use of the same image analysis system to detect genetic damage in human lymphocytes treated with doxorubicin in the Comet and fluorescence in situ hybridisation (FISH) assays. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 390, n. 1, p. 69-77, 1997.
- ANJOS FERREIRA, A.L., et al. Effect of Lycopene on Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity: An Echocardiographic, Histological and Morphometrical Assessment. **Basic & clinical pharmacology & toxicology**, v. 101, n. 1, p. 16-24, 2007.
- ARAÚJO, F. D. A review of *Caryocar brasiliense* (Caryocaraceae) – an economically valuable species of the central Brazilian cerrados. **Economic Botany**, v.9, n.1, p.40-48, 1995
- ASARE, G. A. et al. Toxicity potentials of the nutraceutical *Moringa oleifera* at supra-supplementation levels. **Journal of Ethnopharmacology**, 2011.
- ASCARI, J.; TAKAHASHI, J.A.; BOAVENTURA, M.A.D. Phytochemical and biological investigations of *Caryocar brasiliense* Camb. **Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas**, v. 9, n. 1, p. 20-28, 2010.
- ATMANI, D. et al. Antioxidant capacity and phenol content of selected Algerian medicinal plants. **Food chemistry**, v. 112, n. 2, p. 303-309, 2009.
- AVMA: Guidelines on Euthanasia. **American Veterinary Medical Association**, 1997.
- AZEVEDO-MELEIRO, C. H.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 17, n. 3, p. 385-396, 2004.
- BAGNATI, M. et al. When and why a water-soluble antioxidant becomes pro-oxidant during copper-induced low-density lipoprotein oxidation: a study using uric acid. **Biochemical Journal**, v. 340, n. 1, p. 143, 1999.
- BALLY, M.B., et al. Studies on the myelosuppressive activity of doxorubicin entrapped in liposomes. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 27, n. 1, p. 13-19, 1990.

BARATTA, M.T., et al. Antimicrobial and antioxidant properties of some commercial essential oils. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 13, n. 4, p. 235-244, 1998.

BARZILAI, A.; YAMAMOTO, K. DNA damage responses to oxidative stress. **DNA repair**, v. 3, n. 8, p. 1109-1115, 2004.

BERTRAM, C.; HASS, R. Cellular responses to reactive oxygen species-induced DNA damage and aging. **Biological chemistry**, v. 389, n. 3, p. 211-220, 2008.

BLOOM, J. C.; BRANDT, J. T. **Toxic Responses of the Blood**. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. Kansas, 2008. p. 455-484.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. L. W. T. Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. **LWT-Food Science and Technology**, v. 28, n. 1, p. 25-30, 1995.

BRENDLER-SCHWAAB, S., et al. The in vivo comet assay: use and status in genotoxicity testing. **Mutagenesis**, v. 20, n. 4, p. 245-254, 2005.

BUSH, T.M. et al. Adverse interactions between herbal and dietary substances and prescription medications: a clinical survey. **Alternative therapies in health and medicine**, v. 13, n. 2, p. 30, 2007.

CAI, H.; HARRISON, D.G. Endothelial dysfunction in cardiovascular diseases: the role of oxidant stress. **Circulation research**, v. 87, n. 10, p. 840-844, 2000.

CARDOSO, L.M.; REIS, B.L.; HAMACEK, F.R.; SANT'ANA, H.M.P. **Chemical characteristics and bioactive compounds of cooked pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) from the Brazilian Savannah**. *Fruits*, v. 68, p. 3-14, 2013.

CASTELLO BRANCO, A.S., et al. Parâmetros Bioquímicos e Hematológicos de Ratos Wistar e Camundongos Swiss do Biotério Professor Thomas George. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 2, p. 209-214, 2011

CERQUEIRA, F. M.; DE MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, v. 30, n. 2, p. 441, 2007.

CHOI, S. W. et al. Vitamins C and E: acute interactive effects on biomarkers of antioxidant defence and oxidative stress. **Mutation research**, v. 551, n. 1-2, p. 109-117, 2004.

CHOUCROUN, P. et al. Comet assay and early apoptosis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 478, n. 1, p. 89-96, 2001.

COLLINS, A.R.; AI-GUO, M.; DUTHIE, S.J. The kinetics of repair of oxidative DNA damage (strand breaks and oxidised pyrimidines) in human cells. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 336, n. 1, p. 69-77, 1995.

COLLINS, A.R. The comet assay for DNA damage and repair. **Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249-261, 2004.

COLLINS, A.R. Investigating oxidative DNA damage and its repair using the comet assay. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 681, n. 1, p. 24-32, 2009.

CONKLIN, K.A. Chemotherapy-associated oxidative stress: impact on chemotherapeutic effectiveness. **Integrative cancer therapies**, v. 3, n. 4, p. 294-300, 2004.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A.; JOST, E. Characterization of nuclear structures containing superhelical DNA. **Journal of Cell Science**, v. 22, n. 2, p. 303-324, 1976.

CORWIN, L.M. e SHLOSS, J. Role of antioxidants on the stimulation of the mitogenic response. **Journal of Nutrition**, v. 110, n. 12, p. 2497-2505, 1980.

COYLE, J. T.; PUTTFARCKEN, P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. **Science**, v. 262, n. 5134, p. 689-695, 1993.

CUTLER, R. G.; MATTSON, M. P. Introduction: The adversities of aging. **Ageing research reviews**, v. 5, n. 3, p. 221-238, 2006.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DANE, S. et al. Acute exercise induced oxidative stress is prevented in erythrocytes of male long distance athletes. **Biology of Sport**, v. 25, n. 2, p. 115, 2008.

DANESI, R. et al. Pharmacokinetic-pharmacodynamic relationships of the anthracycline anticancer drugs. **Clinical pharmacokinetics**, v. 41, n. 6, p. 431-444, 2002.

DAVIES, K. J.; GOLDBERG, A. L. Oxygen radicals stimulate intracellular proteolysis and lipid peroxidation by independent mechanisms in erythrocytes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 262, n. 17, p. 8220-8226, 1987.

DE PINHOI, L. et al. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**, v. 42, n. 2, p. 326-331, 2012.

DEL RIO, D; STEWART, J.; PELLEGRINI, N. A review of recent studies on malondialdehyde as toxic molecule and biological marker of oxidative stress. **Nutrition, metabolism and cardiovascular diseases**, v. 15, n. 4, p. 316-328, 2005.

DEPARTAMENT OF TOXICOLOGY. Universität Würzburg. Figura: The Comet Assay. Disponível em < http://www.toxikologie.uni-wuerzburg.de/en/general_information>. Acessado em 15 de abril de 2013.

DRÖGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological reviews**, v. 82, n. 1, p. 47-95, 2002.

DUTTA, D.; CHAUDHURI, U.R.; CHAKRABORTY, R. Structure, health benefits, antioxidant property and processing and storage of carotenoids. **African Journal of Food, Agriculture, Nutrition and Development**, v. 4, n. 13, 2011.

ESTERBAUER, H.; CHEESEMAN, K.H. Determination of aldehydic lipid peroxidation products: malonaldehyde and 4-hydroxynonenal. **Methods in enzymology**, v. 186, p. 407-421, 1990.

FANG, Y.Z. et al. Free radicals, antioxidants, and nutrition. **Nutrition**, v. 18, n.10, p. 872-879, 2002.

FACIOLI, N. L.; GONÇALVES, L. A. G. Modificação por via enzimática da composição triglicéridica do óleo de pequi (*Caryocar brasiliense* Camb). **Química Nova**, v. 21, n. 1, p. 16-19, 1998.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37-59, 1995.

FADILLIOGLU, E. et al. Protective effects of caffeic acid phenethyl ester on doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats. **Journal of Applied Toxicology**, v. 24, n. 1, p. 47-52, 2004.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. **Nature protocols**, v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M. et al. Molecular mechanisms of micronucleus, nucleoplasmic bridge and nuclear bud formation in mammalian and human cells. **Mutagenesis**, v. 26, n. 1, p. 125-132, 2011.

FERREIRA, M. B. Frutos comestíveis do Distrito Federal. III. Piqui, mangaba, marolo e mamãozinho. **Revista Cerrados**, Brasil, v. 5, n. 20, p. 225, 1973.

FERREIRA, A. L. A.; MATSUBARA, L. S. Radicais livres: conceitos, doenças relacionadas, sistema de defesa e estresse oxidativo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 43, n. 1, p. 61-68, 1997.

FERREIRA, A.L.A., et al. Tomato-oleoresin supplement prevents doxorubicin-induced cardiac myocyte oxidative DNA damage in rats. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 631, n. 1, p. 26-35, 2007.

FUJITA, K. et al. Therapeutic approach to neurodegenerative diseases by medical gases: focusing on redox signaling and related antioxidant enzymes. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2012, 2012.

FURTADO, M. A. et al. Antimutagenicity of rosmarinic acid in Swiss mice evaluated by the micronucleus assay. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 657, n. 2, p. 150-154, 2008.

GARTEL, A.L.; TYNER, A.L. The role of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21 in apoptosis. **Molecular cancer therapeutics**, v. 1, n. 8, p. 639-649, 2002.

GOCKE, E.; TANG, L.; SINGER, T. Exposure to Ethylating Agents: Where Do the Thresholds for Mutagenic/Clastogenic Effects Arise?. **Genes and Environment**, v. 34, n. 4, p. 171-178, 2012.

GRANADOS-PRINCIPAL, S. et al. New advances in molecular mechanisms and the prevention of adriamycin toxicity by antioxidant nutrients. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, n. 6, p. 1425-1438, 2010.

GUIDELINE, ICH Harmonized Tripartite. Timing of non-clinical safety studies for the conduct of human clinical trials for pharmaceuticals. **Federal Register**, v. 62, p. 62922-62925, 1997.

GUTTERIDGE, J. Lipid peroxidation and possible hydroxyl radical formation stimulated by the self-reduction of a doxorubicin-iron (III) complex. **Biochemical pharmacology**, v. 33, n. 11, p. 1725-1728, 1984

HALLIWELL, Barry. Oxidative stress and cancer: have we moved forward?. **Biochemical Journal**, v. 401, p. 1-11, 2007.

HARTMANN, A. et al. Recommendations for conducting the in vivo alkaline Comet assay. **Mutagenesis**, v. 18, n. 1, p. 45-51, 2003.

HAYEK, M.G., et al. Dietary conjugated linoleic acid influences the immune response of young and old C57BL/6NCrlBR mice. **The Journal of nutrition**, v. 129, n. 1, p. 32-38, 1999.

HERMES-LIMA, M. Oxygen in biology and biochemistry: Role of free radicals. In: **Kenneth B. Storey**. Functional Metabolism: Regulation and Adaptation. New Jersey : Wiley-Liss, Inc., 2004. p. 319-368.

HIGBY, WK. A Simplified Method for Determination of Some Aspects of the Carotenoid Distribution in Natural and Carotene-Fortified Orange Juice. **Journal of Food Science**, v. 27, n. 1, p. 42-49, 1962.

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

HUDA-FAUJAN, N. et al. Antioxidant activity of plants methanolic extracts containing phenolic compounds. **African Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 3, 2009.

JAGETIA, G.C. e REDDY, T.K. The grapefruit flavanone naringin protects against the radiation-induced genomic instability in the mice bone marrow: a micronucleus study. **Mutation research**, v. 519, n. 1-2, p. 37-48, 2002.

JALOSZYŃSKI, P. et al. Bleomycin-induced DNA damage and its removal in lymphocytes of breast cancer patients studied by comet assay. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 385, n. 3, p. 223-233, 1997.

JANERO, DR. Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 9, n. 6, p. 515-540, 1990.

JENG, K.C., et al. Supplementation with vitamins C and E enhances cytokine production by peripheral blood mononuclear cells in healthy adults. **The American journal of clinical nutrition**, v. 64, n. 6, p. 960-965, 1996.

JENSEN, S.J.K. Oxidative stress and free radicals. **Journal of Molecular Structure: THEOCHEM**, v. 666, p. 387-392, 2003.

KAISEROVÁ, H., et al. Flavonoids as protectors against doxorubicin cardiotoxicity: role of iron chelation, antioxidant activity and inhibition of carbonyl reductase. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease**, v. 1772, n. 9, p. 1065-1074, 2007.

KÄHKÖNEN, M. P. et al. Antioxidant activity of plant extracts containing phenolic compounds. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 47, n. 10, p. 3954-3962, 1999.

KAMINSKI, N. E., KAPLAN, B. L. F.; HOLSAPPLE, M. P. **Toxic Responses of the Immune System**. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). Casarett and Doull's Toxicology: The basic science of poisons. Kansas, 2008. p. 485-556.

KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research/DNA Repair**, v. 363, n. 2, p. 89-96, 1996.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M.; HOCEVAR, B.A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic pathology**, v. 38, n. 1, p. 96-109, 2010.

KLINK, C. A.; MACHADO, R.B. A conservação do cerrado brasileiro. **Megadiversidade**, v.1, n.1, p.147-155, 2005.

KONTA, E. M., et al. Evaluation of the Antihypertensive Properties of Yellow Passion Fruit Pulp (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) in Spontaneously Hypertensive Rats. **Phytotherapy Research**, 2013.

KOSTORYZ, E.L.; YOURTEE, D.M. Oxidative mutagenesis of doxorubicin-Fe (III) complex. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 490, n. 2, p. 131-139, 2001.

KURATA, M.; SUZUKI, M.; AGAR, N. S. Antioxidant systems and erythrocyte life-span in mammals. **Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Comparative Biochemistry**, v. 106, n. 3, p. 477-487, 1993.

LESGARDS, J. F. et al. Effect of reactive oxygen and carbonyl species on crucial cellular antioxidant enzymes. **Chemico-biological interactions**, v. 190, n. 1, p. 28-34, 2011.

L'ECUYER, T. et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death. **American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology**, v. 291, n. 3, p. H1273-H1280, 2006.

LIMA, A. et al. Composição química e compostos bioativos presentes na Polpa e na amêndoa do pequi (*Caryocar brasiliense*, Camb.). **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal - SP, v. 29, n. 3, p. 695-698, 2007.

LIMA, A. **Caracterização química, avaliação da atividade antioxidante *in vitro* e *in vivo*, e identificação dos compostos fenólicos presentes no pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.)**. Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Departamento de Alimentos e Nutrição Experimental. Tese de Doutorado, 2008, 182 p.

LOUREIRO, A.P. M.; DI MASCIO, P.; MEDEIROS, M.H.G. Formação de adutos exocíclicos com bases de DNA: implicações em mutagênese e carcinogênese. **Química Nova**, v. 25, n. 5, p. 777-793, 2002.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, vol. 1, p. 368, 2002.

MARIANO-DA-SILVA, S. et al. Chemical characteristics of pequi fruits (*Caryocar brasiliense* Camb.) native of three municipalities in the State of Goiás-Brazil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 4, p. 771-777, 2009.

MARTÍNEZ, A.; VARGAS, R.; GALANO, A.. What is important to prevent oxidative stress? A theoretical study on electron-transfer reactions between carotenoids and free radicals. **The Journal of Physical Chemistry B**, v. 113, n. 35, p. 12113-12120, 2009.

MATÉS, J. M. Effects of antioxidant enzymes in the molecular control of reactive oxygen species toxicology. **Toxicology**, v. 153, n. 1, p. 83-104, 2000.

MEISSNER, C. Mutations of mitochondrial DNA—cause or consequence of the ageing process?. **Zeitschrift für Gerontologie und Geriatrie**, v. 40, n. 5, p. 325-333, 2007.

MIRA, N. U. M., et al. Extração, análise e distribuição dos ácidos fenólicos em genótipos pigmentados e não pigmentados de arroz (*Oryza sativa* L.). **Ciênc tecnol aliment**, v. 28, n. 4, p. 994-1002, 2008.

MIRANDA, C. J. et al. Hfe deficiency increases susceptibility to cardiotoxicity and exacerbates changes in iron metabolism induced by doxorubicin. **Blood**, v. 102, n. 7, p. 2574-2580, 2003.

MIRANDA-VILELA, A. L.; RESCK, I. S.; GRISOLIA, C. K. Antigenotoxic activity and antioxidant properties of organic and aqueous extracts of pequi fruit (*Caryocar brasiliense* Camb.) pulp. **Genetics and Molecular Biology**, v. 31, n. 4, p. 956-963, 2008.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Characterization of the major nutritional components of *Caryocar brasiliense* fruit pulp by NMR spectroscopy. **Química Nova**, v. 32, n. 9, p. 2310-2313, 2009a.

MIRANDA-VILELA, A. L. et al. Dietary carotenoid-rich pequi oil reduces plasma lipid peroxidation and DNA damage in runners and evidence for an association with MnSOD genetic variant-Val9Ala. **Genet Mol Res**, v. 8, n. 4, p. 1481-1495, 2009b.

MIZUTANI, H., et al. Distinct mechanisms of site-specific oxidative DNA damage by doxorubicin in the presence of copper (II) and NADPH-cytochrome P450 reductase. **Cancer science**, v. 94, n. 8, p. 686-691, 2003.

MOLYNEUX, P. The use of the stable free radical diphenylpicrylhydrazyl (DPPH) for estimating antioxidant activity. **Songklanakarin J Sci Technol**, v. 26, n. 2, p. 211-219, 2004.

MONTEIRO, L. Valores de referência do RDW-CV e do RDW-SD e sua relação com o VCM entre os pacientes atendidos no ambulatório do Hospital Universitário Oswaldo Cruz-Recife, PE; Reference values for RDW-CV and RDW-SD and their relationship to mean corpuscular volume among clinical patients of the Oswald Cruz Teaching Hospital, Recife, Brazil. **Rev. bras. hematol. hemoter**, v. 32, n. 1, p. 34-39, 2010.

MOON, J. K.; SHIBAMOTO, T. Antioxidant assays for plant and food components. **Journal of agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 5, p. 1655-1666, 2009.

MÜLLER, L.; FRÖHLICH, K.; BÖHM, V. Comparative antioxidant activities of carotenoids measured by ferric reducing antioxidant power (FRAP), ABTS bleaching assay (α TEAC), DPPH assay and peroxy radical scavenging assay. **Food Chemistry**, v. 129, n. 1, p. 139-148, 2011.

MYERS, C. E., et al. Oxidative destruction of erythrocyte ghost membranes catalyzed by the doxorubicin-iron complex. **Biochemistry**, v. 21, n. 8, p. 1707-1713, 1982.

NAVES, R.V. **Espécies frutíferas nativas do cerrado de Goiás: caracterização e influências do clima e dos solos**. Universidade Federal de Goiás, Escola de Agronomia e Engenharia de Alimentos, 1999. 206p.

OCTAVIA, Y., et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: From molecular mechanisms to therapeutic strategies. **Journal of molecular and cellular cardiology**, 2012.

OECD: Organização para a Cooperação e o Desenvolvimento Econômico, Diretriz # 474, "Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test", 1997.

OLIVEIRA, M. DE; GUERRA, N. **Aspectos agrônômicos e de qualidade do pequi**. Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2008. 32 p.

OSTLING, O.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 123, n. 1, p. 291-298, 1984.

PASSOS, J. F.; SARETZKI, G.; VON ZGLINICKI, T. DNA damage in telomeres and mitochondria during cellular senescence: is there a connection?. **Nucleic acids research**, v. 35, n. 22, p. 7505-7513, 2007.

PAULA-JU, W. et al. Leishmanicidal, antibacterial, and antioxidant activities of Caryocar brasiliense Cambess leaves hydroethanolic extract. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 625-630, 2006.

PRICE, K. R. et al. The chemistry and biological significance of saponins in foods and feedingstuffs. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 26, n. 1, p. 27-135, 1987.

PYLES, L. A.; STEJSKAL, E. J.; EINZIG, S. Spectrophotometric measurement of plasma 2-thiobarbituric acid-reactive substances in the presence of hemoglobin and bilirubin interference. In: **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)**. Royal Society of Medicine, 1993. p. 407-419.

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

SWIFT, L. P. et al. Doxorubicin-DNA adducts induce a non-topoisomerase II-mediated form of cell death. **Cancer research**, v. 66, n. 9, p. 4863-4871, 2006.

RAMOS, M.I.L.; UMAKI, M.C.S. HIANE, P.A.; FILHO, M.M.R. **Efeito do cozimento convencional sobre os carotenóides próvitamínicos "A" da polpa do piqui (*Caryocar brasiliense* Camb)**. Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos (CEPPA), Curitiba, v.19, n.1, p.2332, 2001.

RAZALI, N. et al. Radical scavenging and reducing properties of extracts of cashew shoots (*Anacardium occidentale*). **Food chemistry**, v. 111, n. 1, p. 38-44, 2008.

RESENDE, F. A. et al. Antimutagenicity of ursolic acid and oleanolic acid against doxorubicin-induced clastogenesis in Balb/c mice. **Life sciences**, v. 79, n. 13, p. 1268-1273, 2006.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B.M.T. **As principais fitofisionomias do bioma cerrado**. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S.P.; RIBEIRO, J.F. (Ed.). *Cerrado: ecologia e flora*. Brasília, DF: Embrapa Informação Tecnológica, 2008. P.151-212.

RIBEIRO, LUCIA REGINA; SALVADORI, Daisy Maria Fávero; MARQUES, Edmundo Kanan. *Mutagênese ambiental*. **Canoas: Ulbra**, 2003.

RIBEIRO, M. C., et al. Influence of the extraction method and storage time on the physicochemical properties and carotenoid levels of pequi (*Caryocar brasiliense* Camb.) oil. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32, n. 2, p. 386-392, 2012.

RIBEIRO, B. D. et al. An ethanol-based process to simultaneously extract and fractionate carotenoids from *Mauritia flexuosa* L. Pulp. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. 32, n. 3, p. 657-663, 2010.

RIBEIRO, D. M. **Propriedades físicas, químicas e bioquímicas de pequi (*Caryocar brasiliense* camb.) de diferentes regiões do cerrado**. Universidade de Brasília. Departamento de Nutrição Humana. Dissertação de mestrado, 64 p., 2011.

ROCHA, W. S., et al. Compostos fenólicos totais e taninos condensados em frutas nativas do cerrado. **Rev. Bras. Frut., Jaboticabal**, v. 33, n. 4, p. 1215-1221, 2011.

ROESLER, R. et al. Atividade antioxidante de frutas do cerrado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 53-60, 2007.

ROESLER, R.; CATHARINO, R.R.; MALTA, L.G.; EBERLIN, M.N.; PASTORE, G. Antioxidant activity of *Caryocar brasiliense* (pequi) and characterisation of components by electrospray ionization mass spectrometry. **Food Chemistry**, v.110, p. 711–717, 2008.

SALDANHA, S. N.; TOLLEFSBOL, Trygve O. The role of nutraceuticals in chemoprevention and chemotherapy and their clinical outcomes. **Journal of oncology**, v. 2012, 2011.

SANDMANN, G. Carotenoid biosynthesis and biotechnological application. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 385, n. 1, p. 4-12, 2001.

SANTHOSH, S. M. et al. *Vipera russelli* venom-induced oxidative stress and hematological alterations: Amelioration by crocin a dietary colorant. **Cell Biochemistry and Function**, v. 31, n. 1, p. 41-50, 2013.

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

SHENG, Y.; PERO, R. W.; WAGNER, H. Treatment of chemotherapy-induced leukopenia in a rat model with aqueous extract from *Uncaria tomentosa*. **Phytomedicine**, v. 7, n. 2, p. 137-143, 2000.

SINGH, N. P. et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184-191, 1988.

SKIBSTED, L. H. Carotenoids in Antioxidant Networks. Colorants or Radical Scavengers. **Journal of agricultural and food chemistry**, v. 60, n. 10, p. 2409-2417, 2012.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation research**, v. 531, n. 1-2, p. 231-251, 2003.

SMITH, D. G., et al. The redox chemistry of the Alzheimer's disease amyloid beta peptide. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, n. 8, p. 1976, 2007.

STRANGE, R. C. et al. *Glutathione-S-transferase* family of enzymes. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 482, n. 1, p. 21-26, 2001.

SWIFT, L. P., REPHAELI, A.; NUDELMAN, A. The cardio-protecting agent and topoisomerase II catalytic inhibitor sobuzoxane enhances doxorubicin-DNA adduct mediated cytotoxicity. **Cancer chemotherapy and pharmacology**, v. 61, n. 5, p. 739-749, 2008.

TERRADAS, M. et al. Genetic activities in micronuclei: Is the DNA entrapped in micronuclei lost for the cell?. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 705, n. 1, p. 60-67, 2010.

TOWNSEND, D. M.; TEW, K. D. The role of glutathione-S-transferase in anti-cancer drug resistance. **Oncogene**, v. 22, n. 47, p. 7369-7375, 2003.

TRACHOOTHAM, D.; ALEXANDRE, J.; HUANG, P. Targeting cancer cells by ROS-mediated mechanisms: a radical therapeutic approach?. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 8, n. 7, p. 579-591, 2009.

TURKMEN, N; SARI, F; VELIOGLU, Y. Sedat. Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. **Food Chemistry**, v. 99, n. 4, p. 835-841, 2006

VALKO, M. et al. Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. **Chemico-Biological Interactions**, v.160, p.1 – 40, 2006.

VASCONCELOS, S. M. L. et al. Espécies reativas de oxigênio e de nitrogênio, antioxidantes e marcadores de dano oxidativo em sangue humano: principais métodos analíticos para sua determinação. **Química Nova**, v. 30, n. 5, p. 1323-1338, 2007.

VERA, R. et al. Caracterização física de frutos do pequizeiro (*Caryocar brasiliense* Camb.) no estado de Goiás. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.35, n.2, p.71-79, 2005.

VIANA, F. A. B. **Guia terapêutico veterinário**. Minas Gerais: Gráfica Editora Cem, 2 ed., p. 464, 2007.

WOOLLARD, G. Retinol acid, carotenes and carotenoids: vitamin A structure and terminology. In: PREEDY, R.P. **Vitamin A and carotenoids: chemistry, analysis, function and effects**. Cambridge: The Royal Society of Chemistry, 2012. p. 3-31.

WONG, V. W. C. et al. The comet assay: a biomonitoring tool for nutraceutical research. **Curr Top Nutraceutical Res**, v. 3, n. 1, p. 1-14, 2005.

XU, X.; PERSSON, H. L.; RICHARDSON, D. R. Molecular pharmacology of the interaction of anthracyclines with iron. **Molecular pharmacology**, v. 68, n. 2, p. 261-271, 2005.

YOUNG, A. J.; LOWE, G. M. Antioxidant and prooxidant properties of carotenoids. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 385, n. 1, p. 20-27, 2001.

YÚFERA, E. P. **Química orgánica básica y aplicada: de la molécula a la industria**. Barcelona: Reverté, 1995. 794p.

ZHANG, Q.H., et al. Protective effects of total saponins from stem and leaf of *Panax ginseng* against cyclophosphamide-induced genotoxicity and apoptosis in mouse bone marrow cells and peripheral lymphocyte cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 1, p. 293-302, 2008.

ZHANG, Y. et al. Mice deficient in both Mn superoxide dismutase and glutathione peroxidase-1 have increased oxidative damage and a greater incidence of pathology but no reduction in longevity. **The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences**, v. 64, n. 12, p. 1212-1220, 2009.

ANEXO

Aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM



Faculdade de Medicina
Universidade de Brasília
Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/FM

Brasília, 25 de janeiro de 2011

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado “ Avaliação Hematológica e Estudo das Atividades Antigenotóxica e Antioxidante do Óleo e dos Extratos Aquoso, Etanólico e Hidroetanólico da Polpa do Fruto de Pequi (*Caryocar brasiliensis* Cam.) em camundongos swiss”, UnBDoc 5330/2011, sob responsabilidade do Prof. César Koppe Grisolia, foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA-FM) da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília.

Carlos Eduardo Ventura Gato dos Santos
Coordenador de Ética no Uso Animal/CEUA/
Faculdade de Medicina/UnB

Prof. Dr. Carlos Eduardo Gato V. dos Santos
Coordenador do CEUA-FM