

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade da  
astaxantina através do ensaio Cometa em células de  
mamífero *in vitro***

**MICHELI DE MORAES FERREIRA**

**2013**

**UFRRJ**

**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E  
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade da  
astaxantina através do ensaio Cometa em células de  
mamífero *in vitro***

**Micheli de Moraes Ferreira**

**Julho, 2013**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade da astaxantina através do  
ensaio Cometa em células de mamífero *in vitro***

**MICHELI DE MORAES FERREIRA**

*Sob a orientação da Professora*

**Shirley de Mello Pereira Abrantes**

*e Co-orientação da Professora*

**Helena Pereira da Silva Zamith**

Projeto para obtenção do título de  
**Mestre em Ciência** do Programa de  
Pós-Graduação em Ciência e  
Tecnologia de Alimentos

Seropédica, RJ  
Julho de 2013

664

F383a Ferreira, Micheli de Moraes, 1982-

T Avaliação da genotoxicidade e antígenotoxicidade da Astaxantina através do ensaio Cometa em células de mamífero in vitro / Micheli de Moraes Ferreira. - 2013.

75 f.: il.

Orientador: Shirley de Mello Pereira Abrantes.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos.

Bibliografia: f. 45-57.

1. Tecnologia de alimentos - Teses. 2. Carotenóides - Teses. 3. Toxicologia genética - Teses. 4. Antioxidantes - Teses. 5. Citoquímica - Teses. I. Abrantes, Shirley de Mello Pereira, 1953- II. Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos. III. Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS**

**MICHELI DE MORAES FERREIRA**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência** no Curso de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM ----/----/----- (Data da defesa)

---

Profa. Dra. Shirley de Mello Pereira Abrantes INCQS/ FIOCRUZ  
(Orientador)

---

Profa. Dra. Cristiane Hess de Azevedo-Meleiro - UFRRJ

---

Prof. Dr. Marco Antonio Mota da Silva - UEZO

Aprender é a única coisa de que a mente nunca se cansa, nunca tem medo e nunca se arrepende.

- Leonardo da Vinci

## **Dedicatória**

Dedico primeiramente a Deus, que me abençoou e permitiu que meus Anjos protetores me guiassem por esta caminhada, me conferindo através da fé, muito amor, muita força, persistência e equilíbrio para conquistar meu objetivo.

Dedico este trabalho á minha família que sempre esteve ao meu lado, de todas as formas possíveis, minha Mãe, ao meu Pai, irmão, tio Luiz, tias, tios e primos, em especial a minha Avó Neide, que sempre esteve presente em minha vida, firme e forte, me apoiando e incentivando minhas escolhas.

## **Agradecimentos**

Às minhas orientadoras Profa Shirley Abrantes e Profa Helena Zamith, que me acolheram, me guiaram, e me incentivaram sempre, que acreditaram no meu trabalho, obrigada, por cada momento de carinho, de disciplina, de orientação, cresci muito com nosso encontro, vocês foram um presente de Deus na minha vida.

Às pessoas do INCQS/FIOCRUZ, que me receberam de braços abertos e fizeram dos meus dias muito mais felizes e leves, durante o andamento de todo o experimento, obrigada pelo apoio, Isabela, Ronald e todos os funcionários. Em especial, Taline e Claudete, que foram meus anjos da guarda no laboratório, sem elas eu não estaria aqui, obrigada, por toda a disponibilidade, carinho, dedicação, risadas e paciência.

Aos meus amigos Leandro, Jefferson, Claudinha, Fernanda, Adilson, Luciano, Erika, Ricardo, Marcio e Sandra, que sempre tinham uma palavra de carinho e incentivo para me animar.

Às minhas lindas da República UP, Vanessa, Aimeé, Aninha, Carol, Manu e Mari, que foi minha "herança" para República, sem esquecer a República Play, Brunão, Ruan, Grilo e God, obrigada por cada momento, foi uma honra fazer parte dessa família.

Às minhas amigas de infância, Clarissa, Sabrina, e os meus irmãos Ruralinos, Jacqueline, Patrícia, Luana, Lana, Luciele e Felipe, obrigada pela presença, carinho, incentivo e companheirismo de tantos anos.

Agradeço de coração aos meus animais, que são o mais puro exemplo de amor e carinho neste mundo e que fazem dos meus dias sempre mais e felizes, em especial a Dalila e Kiko, que neste momento são estrelas no céu, deixando eternas saudades no meu coração.

À UFRRJ, minha instituição Mãe, que mais uma vez me acolheu e que através pude realizar mais uma etapa vitoriosa da minha vida. Tenho muito orgulho de ser filha desta casa. Aos meus colegas de caminhada do mestrado e a todos os professores e funcionários do DTA/IT, muito obrigada.

À CAPES/Reuni, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

FERREIRA.M.M, **Projeto Avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade da astaxantina através do ensaio Cometa em células de mamífero *in vitro*** 2013. 75 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos). Instituto Tecnologia, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013

A cor e a aparência dos alimentos são os primeiros atributos fundamentais, se não os mais importantes, a serem avaliados pelos consumidores no momento da sua aquisição. Os alimentos podem ser mais nutritivos, seguros e mais econômicos, no entanto, se não forem atraentes, sua aquisição não ocorrerá. O salmão é basicamente um peixe branco que torna-se rosado pela ingestão do camarão. O pigmento vermelho armazenado presente no músculo ou na casca do camarão e que se acumula no tecido adiposo é adquirido através da ingestão das algas e dos organismos unicelulares pelos camarões do mar. Os carotenóides utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e de ração são corantes naturais responsáveis pelas cores amarelas, laranja e vermelha. O salmão criado em aquicultura não tem acesso aos organismos citados acima, entretanto é adicionado à sua ração a astaxantina (ATX), substância que confere uma cor rosada à sua carne. A ATX (3,3'-dihidroxi-beta,beta-caroteno-4,4'-diona) é um pigmento carotenóide oxigenado, que confere a característica de coloração rosa-avermelhada de alguns peixes, crustáceos, aves e microrganismos. A ATX apresenta potente atividade na eliminação de radicais livres e na proteção quanto à peroxidação de lipídios e quanto aos danos causados pela oxidação das membranas celulares e de tecidos. Neste trabalho investigamos em células sanguíneas humanas *in vitro*, a genotoxicidade e o efeito protetor ou antigenotoxicidade de ATX na indução de dano oxidativo ao DNA causado pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>). A ATX (0,1 a 5 µM) não foi citotóxica em células sanguíneas humanas sendo citotóxica na faixa de 10 a 1000 µM induzindo de 1 a 10% de letalidade celular quando comparado ao controle-solvente dimetilsulfóxido (DMSO 5%). A ATX nos ensaios Cometa realizados não induziu dano ao ADN (p>0,1) em células sanguíneas humanas na faixa testada de 0,1 a 500 µM quando comparado ao DMSO 5%.. O H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (12,5 a 2000 µM) não foi citotóxico não causando letalidade celular em células sanguíneas humanas, porém foi genotóxico (p<0,05) causando dano ao ADN. Em dois ensaios independentemente realizados, o pré-tratamento *in vitro* das células sanguíneas humanas durante 2h pela ATX (25, 50, 100, 250 e 500 µM) causou redução altamente significativa (p<0,01) do efeito genotóxico causado por 200 e 2000 µM do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 min. Através desse estudo demonstramos o efeito protetor da ATX quanto à indução de dano oxidativo ao ADN causado pelo . H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células sanguíneas humanas *in vitro*.

Palavras chaves: Carotenóides, genotoxicidade, ensaio cometa

## Abstract

FERREIRA.MM, Project: **Evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of astaxanthin by the Comet assay in mammalian cells in vitro 2013**. P. 75. Thesis (Master of Science in Food). Technology Institute, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ. 2013

The color and appearance of food are the first fundamental attributes, if not more important, to be evaluated by consumers at the time of its acquisition. The food can be more nutritious, safer and more economical, however, if not attractive, its acquisition will not occur. The salmon is basically a white fish that becomes pink by eating shrimp. The stored red pigment present in muscle or shrimp in the shell and accumulates in adipose tissue is acquired through ingestion algae and unicellular organisms by the shrimps from the sea. Carotenoids used in food, pharmaceutical, cosmetics and food are natural colorants responsible for yellow, orange and red. The raised salmon aquaculture has no access to the bodies mentioned above, however, it is added to their feed astaxanthin (ATX), a substance that gives a pinkish color to your meat. ATX (3,3'-dihydroxy-beta, beta-carotene-4, 4'-dione) is a oxygenated carotenoid pigment that confers the characteristic reddish-pink coloration of certain fish, crustaceans, birds and microorganisms. The ATX has potent activity in scavenging free radicals and protecting against lipid peroxidation and the damage caused by oxidation of cell membranes and tissues. In this study we investigated in human blood cells in vitro genotoxicity and protective effect or antigenotoxicity ATX induction of oxidative DNA damage caused by hydrogen peroxide ( $H_2O_2$ ). ATX (0.1 to 5  $\mu M$ ) was not cytotoxic in human blood cells are cytotoxic in the range 10-1000  $\mu M$  inducing 1 to 10% mortality when compared to control cell-solvent dimethylsulfoxide (DMSO 5%). The ATX Comet assays performed did not induce DNA damage ( $p > 0.1$ ) on human blood cells tested in the range 0.1 to 500  $\mu M$  compared to the 5% DMSO.  $H_2O_2$  (12.5 to 2000  $\mu M$ ) was not cytotoxic and did not cause cell lethality in human blood cells but was genotoxic ( $p < 0.05$ ), causing damage to DNA. In two experiments independently performed, the pre-treatment of cells in vitro human blood for 2h the ATX (25, 50, 100, 250 and 500  $\mu M$ ) caused a highly significant reduction ( $p < 0.01$ ) caused by genotoxic 200 and 2000  $\mu M$   $H_2O_2$  for 10 min. Through this study we demonstrated the protective effect of ATX on the induction of oxidative damage to DNA caused by  $H_2O_2$  in human blood cells in vitro.

**Key Word:** Carotenoids, genotoxicity, comet assays

## LISTA DE ABREVIACÕES E SÍMBOLOS

<b>ATX</b>	Astaxantina
<b>°C</b>	Grau Celsius
<b>µg.kg<sup>1</sup></b>	Unidade de medida micro gramas por kilogramas
<b>µL</b>	Unidade de medidaMicro Litro
<b>µM</b>	Micro Molar
<b>3R</b>	Refinement, Reduction e Replacement
<b>AND</b>	Acido desoxirribonucleico
<b>BPF</b>	Ponto Baixo de Fusão
<b>C40</b>	Quarenta carbonos
<b>CAT</b>	Catalase
<b>CK</b>	Celulas Killer
<b>CLAE</b>	CromatografiaLiquida Alta Eficiência
<b>CP</b>	Ciclosfosfamida
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>EDTA</b>	Sal dissódico do ácido tetra-acéticoetilenodiamino
<b>g.L<sup>1</sup></b>	Unidade de medida grama por litro
<b>GSH-Px</b>	Glutationa peroxidase
<b>h</b>	Unidade de tempo horas (h)
<b>H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>	Peróxido de hidrogênio
<b>IgG</b>	Imunoglobulina G
<b>IgM</b>	Imunoglobulina M
<b>INCQS</b>	Instituto Nacional de Controle de Qualidade em Saúde
<b>Ip</b>	Intraperitoniamente
<b>v.o.</b>	Via oral
<b>mA</b>	Miliampère
<b>mg.kg<sup>1</sup></b>	Unidade de medida miligrama por kilograma
<b>mim</b>	Unidade de tempo minuto (mim)
<b>mL</b>	Mililitros
<b>MMS</b>	Solução de sulfonato de metil metano
<b>NMDA</b>	Glutamato N-metil-D-aspartato
<b>NO<sub>2</sub><sup>-</sup>/NO<sub>3</sub><sup>-</sup></b>	Degradação do Oxido nítrico/ Oxido Nitroso
<b>PBS</b>	Solução salina tamponada de fosfato sem cálcio e magnésio
<b>POP</b>	Procedimento Operacional Padrão
<b>SCG</b>	Single Cell Gel
<b>SK-N-SH</b>	Células de neuroblastoma humano
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>UI/mL</b>	Unidade internacional por mililitros
<b>US\$</b>	Unidade Monetária Americana (Dólar)
<b>UV</b>	Luz ultravioleta
<b>UVA</b>	Luz ultravioleta A
<b>Volts</b>	Unidade de medida de potencial elétrico

## SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO .....	1
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	1
2.1 Corantes Carotenóides.....	1
2.1.1 Astaxantina.....	1
2.1.2 Estrutura Química e Propriedades Biológicas da ATX .....	4
2.1.3 Fontes da extração de ATX .....	5
2.1.4 Emprego da ATX na alimentação .....	6
2.2 5 Avaliação toxicológica da ATX .....	10
2.2 Ensaio Cometa.....	11
3. OBJETIVO.....	12
4. JUSTIFICATIVA.....	12
5. MATERIAL E MÉTODOS .....	13
5.1 Padrões Analíticos e Reagentes .....	13
5.2 Insumos e soluções do Ensaio Cometa.....	13
5.3 Equipamentos e Outros itens .....	14
5.4 Ensaio Cometa da ATX:.....	14
5.4.1 Citotoxicidade da ATX.....	14
5.4.2 Ensaio Cometa da ATX.....	15
5.5 Ensaio Cometa do peróxido de hidrogênio .....	20
5.5.1 Citotoxicidade do peróxido de hidrogênio .....	20
5.5.2 Ensaio Cometa do peróxido de hidrogênio.....	21
5.6 Ensaio Cometa da combinação da ATX com peróxido de hidrogênio.....	21
5.6.1 – Citotoxicidade da combinação ATX com peróxido de hidrogênio .....	21
5.6.2 Ensaio Cometa da combinação da ATX com peróxido de hidrogênio.....	22
6. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	22
6.1. Ensaio de citotoxicidade e Cometa da ATX .....	22
6.2 Ensaio de citotoxicidade e Cometa do peróxido de hidrogênio.....	28

6.3Efeito da ATX na citotoxicidade e genotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio (H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> ) em células sanguíneas humanas <i>in vitro</i> através do ensaio Cometa.....	34
8. BIBLIOGRAFIA .....	47
Anexo .....	58

## 1- INTRODUÇÃO

A cor é a primeira informação que temos de um alimento. A partir da cor bem como da textura podemos classificar qualquer alimento inicialmente, por exemplo, em agradável/aceitável ou mesmo repugnante. Geralmente são fatores facilmente perceptíveis e avaliados pelos consumidores, que podem ser altamente nutritivos e conferir ganhos à saúde. A aceitação do alimento está pois, diretamente e principalmente relacionada à sua aparência.

A aparência de um alimento também pode contribuir de forma inversa quanto à avaliação pelo consumidor, pois, um alimento com poucos nutrientes pode ter sua apresentação melhorada para que seja mais requisitada, pelo menos em um primeiro instante. A cor acompanhada pela primeira impressão da textura faz parte do apelo sensorial do produto.

Com a intenção de solucionar este problema, várias pesquisas têm sido conduzidas com o objetivo de buscar fontes alternativas de pigmentos carotenóides a serem adicionadas à ração de galinhas poedeiras para melhorar a coloração das gemas e a ração de peixes para conferir cor a musculatura do pescado. Devido à tendência atual para o uso de produtos naturais, muitas algas, leveduras, vegetais e microrganismos estão sendo estudados e recomendados para utilização como suplemento pigmentante

O objetivo do estudo foi inicialmente a avaliação de dano ao ácido desoxirribonucléico (ADN) ou genotoxicidade induzido pela astaxantina (ATX) em células sanguíneas humanas *in vitro* empregando o ensaio SCG (*Single Cell Gel*) ou ensaio Cometa em condições alcalinas. Uma vez comprovada a não genotoxicidade de ATX estudamos o efeito protetor ou antigenotoxicidade de ATX na indução de dano oxidativo ao ADN causado pelo peróxido de hidrogênio através do mesmo ensaio.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Corantes carotenóides

Os carotenóides são corantes naturais responsáveis pelas cores amarela, laranja e vermelha, utilizados nas indústrias alimentícia, farmacêutica, de cosméticos e ração. A produção biotecnológica de carotenóides vem se destacando devido a fatores tais como possibilidade de utilização de substratos de baixo custo para a bioprodução; denominação de substâncias naturais; pequeno espaço para produção, e controle das condições de cultivo. Muitos microrganismos produzem carotenóides, porém nem todos são industrialmente interessantes (VALDUGA,2009). Em animais aquáticos, possui muitas funções, tais como proteção de ácidos graxos poliinsaturados contra oxidação, proteção contra radiação ultravioleta, entre outros (HIGUERA-CIAPARA et al., 2006)

### 2.1.1 ATX astaxantina

A astaxantina (3,3'-dihidroxi-beta,beta-caroteno-4,4'-diona) é um pigmento carotenóide oxigenado, que confere a característica de coloração rosa-avermelhada de alguns peixes, crustáceos, aves e microrganismos, apresentando forte atividade de eliminar radicais livres e proteger contra peroxidação de lipídios e danos causados pela oxidação das membranas celulares e tecidos. Como os carotenóides não são sintetizados pelos animais, atualmente é crescente o seu uso como alimento funcional e suplemento farmacêutico. Sua adição é utilizada como suplemento alimentar nas dietas de peixes e crustáceos em aquicultura, fornecendo características de pigmentação destes animais, e na criação de aves domésticas visa aumentar a cor da gema do ovo, incrementando sua qualidade e aceitação no mercado consumidor (FONSECA et al., 2006).

No Brasil a aplicação de corantes diretamente na carne do pescado é proibida, inclusive pelo *Codex Alimentarius*. Entretanto conforme a Resolução nº 1, de 7 de março de 2008 do Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento, trata sobre o utilização de corantes e seu uso na ração para promoção de cor na musculatura, é permitido. Como não temos leis brasileiras sobre o assunto, são utilizadas legislações internacionais para nos basearmos na segurança. Os limites que impomos a outros países quando da exportação de pescado colorido artificialmente por ração segue, principalmente, a União Européia. O Art. 1º da resolução tem a seguinte redação:

Adotar a expressão "Peixe de cultivo: coloração resultante do corante utilizado na ração" em todos os rótulos aplicáveis aos produtos que contenham peixes provenientes da aquicultura cuja coloração da musculatura tenha sido obtida por meio da alimentação com rações adicionadas de corantes.

A ATX é o principal pigmentocarotenóide encontrado em animais aquáticos. Ele tem sido utilizado como uma fonte de pigmentação para peixes marinhos na aquicultura e também está sendo investigado para alimentos, cosméticos e aplicação médica, devido à sua alta atividade antioxidante. Os microrganismos, alga do gênero *Haematococcus*, a levedura vermelha *Phaffiarhodozyma*, e o invertebrado *Euphausia superba* (krill), etc, são fontes de ATX. A ATX sintética (Figura 2) é produzida por algumas empresas por meio de complexas reações químicas e seu mercado foi estimado em 100 milhões de dólares por ano no início dos anos 90. No entanto, não é, na mesma forma como encontrada na natureza, sua estabilidade e atividades são mais baixas do que o produto natural. A astaxantina foi primeiro isolada e identificada a partir de lagostas, em 1938, e muitos estudos foram realizados para extrair astaxantina a partir de várias fontes, por solventes orgânicos (LIM et al., 2002).

Os carotenóides são um grupo de mais de 700 pigmentos naturais lipossolúveis, que são principalmente produzidos por algas do fito plâncton e plantas. Estes pigmentos são responsáveis pela grande variedade de cores vistas na natureza, os mais visíveis são o amarelo brilhante, as cores laranja e vermelha das frutas, folhas e animais aquáticos. Entre as numerosas classes de pigmentos, os carotenóides são os mais difundidos e quimicamente e estruturalmente diversos. Apenas as plantas, algas, alguns fungos e algumas espécies de bactérias sintetizam carotenóides, portanto, devem ser fornecidos na dieta animal. Os carotenóides são absorvidos através da dieta de animais, por vezes convertidos em outros carotenóides e são incorporados aos vários tecidos. Algumas espécies de peixes, e vários

crustáceos (*Penaeus japonicus* e *Penaeus monodon*), têm os mecanismos enzimáticos necessários para converter os carotenóides em outras formas, tais como ATX (LORENZ & CYSEWSKI, 2000).

Os carotenóides ingeridos pelos animais em sua alimentação são absorvidos pelo intestino delgado, principalmente na área do jejuno-íleo e uma pequena porção no duodeno, junto com outros lipídeos (EL BOUSHY; RATERINK, 1992; LATSCHA, 1990; NYS, 2000; PEREZVENDRELL et al., 2001).

Nos últimos anos, muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos. A imensa biodiversidade e conseqüente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida das culturas microalgais, aliadas ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas. Nesse sentido, cultivos de microalgas têm sido realizados visando à produção de biomassa, tanto, para uso na elaboração de alimentos, quanto, para a obtenção de compostos naturais com alto valor no mercado mundial. Dentre os inúmeros compostos extraídos, ou com potencial de exploração comercial, podem ser relacionados ácidos graxos poliinsaturados, carotenóides, ficobilinas, polissacarídeos, vitaminas, esteróis e diversos compostos bioativos naturais (antioxidantes, redutores do colesterol etc.), os quais podem ser empregados especialmente no desenvolvimento de alimentos funcionais, por suas propriedades nutricionais e farmacêuticas (DERNER et al., 2006)

A deposição de ATX em trutas e salmões é muito mais eficiente, comparativamente a outros carotenóides, sendo que a maioria dos criadores utiliza ATX sintética. Contudo, o custo deste insumo é elevado, aliado ao fato de que suas formulações podem conter configurações químicas indesejadas de ATX e seus derivados, diminuindo sua eficiência na pigmentação (LATSCHA, 1990 e TORRISEN, 1995). Adicionalmente, observa-se uma tendência mundial à utilização de fontes naturais de nutrientes e à exclusão de componentes sintéticos da cadeia alimentar. Tais fatores têm aumentado o interesse em fontes naturais de ATX, sendo que diversas empresas têm investido na obtenção deste pigmento, a partir de fontes naturais (MCCOY, 1999). Atualmente, as fontes naturais mais promissoras de ATX são a microalga *Haematococcus pluvialis* (GOUVEIA et al., 1996) e a levedura *Phaffia rhodozyma* (MORIEL, 2005). Neste contexto, a necessidade de obtenção de ATX a partir de fontes naturais com elevada produtividade, sustentabilidade e baixo custo, aliado ao uso de processos eficientes de extração e quantificação daquele carotenóide, vem direcionando pesquisas nesta área, buscando incrementos de qualidade e redução do custo do pescado produzido em cativeiro.

A aplicação mais comum tem sido na aquicultura, para a alimentação direta ou indireta de algumas espécies de peixes, moluscos, crustáceos e de diversos organismos forrageiros de interesse econômico. São empregadas espécies da família *Bacillariophyceae* (*Chaetoceros* spp. Ehrenberg, *Thalassiosira* spp. Cleve, *Phaeodactylum tricornutum* Bohlin e *Skeletonema costatum* Greville), da família *Haptophyceae* (*Isochrysis* spp. Parke), *Cryptophyceae* (*Rhodomonas* spp. Karsten), *Chrysophyceae* (*Monochrysis* spp. Skuja), *Prasinophyceae* (*Tetraselmis* spp. Stein), *Cyanophyceae* (*Arthrospira* spp. e *Spirulina* spp.) e *Chlorophyceae* (*Chlorella* spp., *Dunaliella* spp. e *Scenedesmus* spp. Bourrely), dentre outras classes e diversas espécies (MULLER-FEUGA, 2004).

## 2.1.2 Estrutura Química e Propriedades Biológicas da ATX

A ATX (Figura 1) é um pigmento encontrado em animais aquáticos, tais como lagosta, siri e camarão. Este pigmento protege contra radicais livres, peroxidação lipídica, danos oxidativos ao colesterol lipoproteína de baixa densidade, oxidação dos ácidos graxos poli-insaturados essenciais e proteção contra os efeitos da luz ultravioleta (UV), membranas celulares, células e tecidos (HU et.al, 2006).

Devido à alta taxa de instauração, fatores tais como calor, luz e ácidos ocasionam isomerização dos carotenóides *trans*, que é a forma mais estável na natureza, para a forma *cis* (Figura 2) promovendo ligeira perda de cor e atividade pró-vitáminica. Os carotenóides são também susceptíveis às oxidações enzimáticas ou não enzimáticas, que dependem da estrutura do carotenóide, disponibilidade de oxigênio, presença de enzimas, metais, pró-oxidantes e antioxidantes, alta temperatura e exposição à luz (JOHNSON & SCHROEDER, 1995).

Os pigmentos podem absorver luz especificamente UV e visível do espectro, o restante é transmitido ou refletido, e apresentam cor. A estrutura responsável pela absorção da luz é o grupamento cromóforo, que nos carotenóides se caracteriza pelas duplas ligações conjugadas. Cada carotenóide é caracterizado por um espectro de absorção eletrônica. Assim, a espectroscopia de absorção é uma importante técnica na análise de carotenóides (GROSS, 1991).

A maioria dos carotenóides são tetraterpenoides com quarenta carbonos (C40) e 8 unidades isoprenoides, ligados de tal forma que a molécula é linear e simétrica, com a ordem invertida no centro. A estrutura básica acíclica C40 pode ser modificada por hidrogenação, desidrogenação, ciclização ou oxidação. A característica de absorção de luz destes pigmentos dá-se devido à cadeia de duplas ligações conjugadas que atua como cromóforo, sendo necessário, aproximadamente, sete ligações duplas conjugadas para que o carotenóide apresente coloração. O sistema de duplas ligações conjugadas também confere a estes pigmentos alta reatividade química, podendo ser facilmente isomerizados e oxidados, principalmente quando submetidos a condições não controladas de processamento e/ou estocagem, mais especificamente em produtos naturais (frutas). Além disso, o calor, a luz, o oxigênio e enzimas como lipoxigenase e/ou ácidos presentes em frutas levam a alterações ou parcial destruição dos pigmentos. A exposição destes pigmentos a tais agentes resulta na formação de isômeros *cis*, epóxidos, diminuição da cor, perda da atividade pró-vitáminica A e quebra da cadeia. (VALDUGA, 2009)

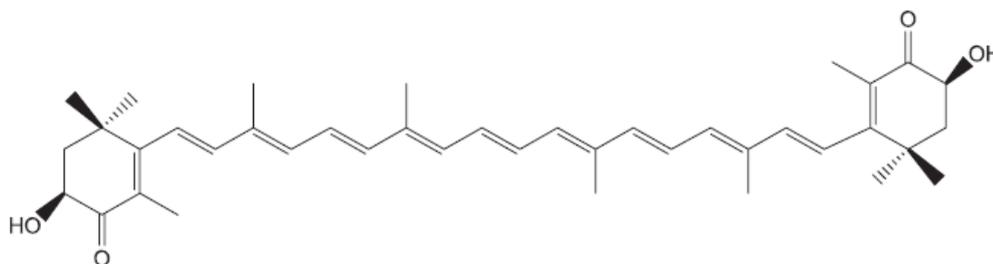


Figura 1 – Estrutura da ATX *all Trans*.

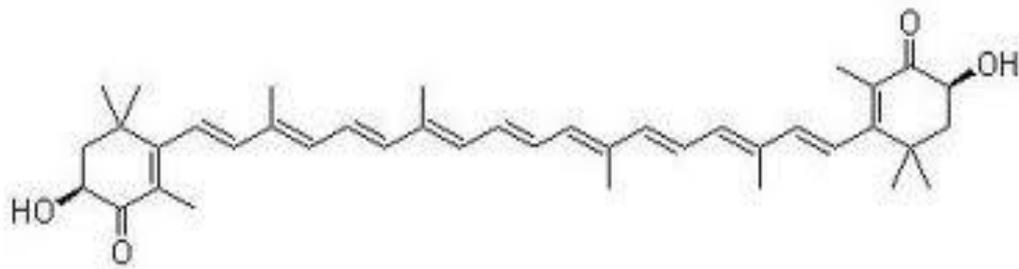


Figura 2 – Estrutura da ATX *Cis*.

Após ingestão, devido a sua lipossolubilidade, a ATX é incorporada em micelas no intestino delgado, se difundindo passivamente na luz intestinal junto com os ácidos graxos. A ATX é incorporada em quilomícrons e estes após perder sua fração lipídica, torna-se suficientemente pequenos para passar através dos capilares sanguíneos, chegando ao fígado, principal órgão para metabolismo e excreção de carotenóides. Neste órgão, a ATX é biotransformada até seus metabólitos. O mecanismo exato pelo qual a ATX é metabolizada no fígado é desconhecido, mas sabe-se que a porção deste carotenóide não metabolizada é incorporada às lipoproteínas de muito baixa densidade antes de chegar a corrente sanguínea novamente (RAJASINGH et al., 2006)

Apesar da ausência da atividade pró-vitamina A, a ATX possui inúmeras propriedades farmacológicas incluindo atividades antioxidante, antiinflamatória (KURASHIGE et al., 1990), imunomoduladora, anticâncer (CHEW et al., 1990) e antidiabetes (UCHIYAMA et al., 2002). Entre tais propriedades, sua atividade antioxidante parece ser responsável pelas demais. A ATX apresentou potencial antioxidante superior a outros carotenóides como zeaxantina, luteína, cantaxantina, e  $\beta$ -caroteno e 100 vezes maior que o  $\alpha$ -tocoferol (NAGUIB, 2000). Essa superioridade estaria relacionada à estrutura química, onde os anéis polares da ATX removeriam espécies reativas de oxigênio na superfície, enquanto a cadeia carbonada agiria no interior da membrana (GOTO et al., 2001). No anel polar da ATX, o grupo hidroxila no átomo de carbono três é apontado como principal sítio de remoção de radicais livres.

Alguns autores têm descrito o efeito protetor da ATX contra danos oxidativos induzidos por radicais hidroxilas e oxigênio singlete (WU et al., 2006). Além disso, tem sido demonstrado que peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e radical superóxido estimulam a biossíntese da ATX em fungos, provavelmente como uma resposta de defesa antioxidante (SCHROEDER & JOHNSON, 1993; SCHROEDER & JOHNSON, 1995; LIU & WU, 2006).

### 2.1.3 Fontes da extração de ATX

Nos últimos anos, muito interesse tem sido focado no potencial biotecnológico das microalgas, principalmente devido à identificação de diversas substâncias sintetizadas por estes organismos. A imensa biodiversidade e conseqüente variabilidade na composição bioquímica da biomassa obtida das culturas microalgas, aliadas ao emprego de melhoramento genético e ao estabelecimento de tecnologia de cultivo em grande escala, vêm permitindo que determinadas espécies sejam comercialmente utilizadas.

Alguns procedimentos são necessários para a extração dos pigmentos, para que eles possam ser usados nos produtos industriais e dessa forma, assimilados pelo consumidor. A cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) é usada para a análise do carotenóide, mas para se chegar neste estágio o carotenóide precisa ser extraído do microrganismo. Partindo desse princípio, seguem alguns métodos. Segundo Squina e Mercadante (2003), atualmente a CLAE tem se mostrado o método de escolha para separação e quantificação de carotenóides.

No entanto, quando esta concentração da fonte de carbono é aumentada, diminui-se drasticamente a produção da ATX (BONFIM, 1999). Isto é explicado pelo fato de que a levedura *Phaffia rhodozyma* apresenta o efeito “Crabtree”, em que o crescimento celular e a produção de ATX ficam comprometidos pelo aumento residual de glicose (REYNDERS, RAWLINGS, HARRISON, 1997).

#### 2.1.4 Emprego da ATX na alimentação

Os carotenóides só podem ser sintetizados por plantas e microrganismos, os animais não são capazes de fazer essa síntese, mas podem absorvê-los por seu alimento. A absorção e o metabolismo dos carotenóides são determinados pela estrutura.

A retenção de carotenóides em animais depende da eficiência de absorção do transporte do aparelho digestório, dos mecanismos de deposição em diversos tecidos, metabolismo e taxa de excreção. Taxas de retenção na dieta de carotenóides em Salmonídeos variam de acordo com fatores tais como: sexo, tamanho, espécie e composição da dieta, mas são geralmente na faixa de 1-18%. Os níveis de carotenóides em Salmonídeos cultivados mostram grandes variações entre indivíduos da mesma espécie, e os valores reportados para Salmonídeos selvagens podem representar diferenças comparativas na capacidade de depositar carotenóides. Fatores que podem também contribuir para observação são as diferentes fontes de pigmento na dieta, o tamanho do peixe, as diferentes fases de maturação, e genética (TOLASA, 2005).

Neste estudo serão abordados a situação na qual é submetido a criação do salmão que é um grande peixe da família *Salmonidae*, que também inclui as trutas. Peculiar aos mares e rios europeus, é muito procurado pela sua apreciadíssima carne rosada, muito saborosa, e criado em aquicultura, especialmente a espécie *Salmo salar*. O salmão do oceano Atlântico volta do mar à água doce para se reproduzir, quase sempre ao mesmo rio em que nasceu. À medida que se aproxima a época da procriação, a cabeça do macho muda de forma, alongando e curvando a mandíbula inferior em forma de gancho e a carne ganha uma coloração esbranquiçada. Enquanto o salmão do oceano Pacífico morre após a reprodução, o do Atlântico se reproduz mais de uma vez.

O salmão é basicamente um peixe branco. O pigmento vermelho é feito através das algas e dos organismos unicelulares, que são ingeridos pelos camarões do mar; o pigmento é armazenado no músculo do camarão ou na casca. Quando os camarões são comidos pelo salmão, estes também acumulam o pigmento nos seus tecidos adiposos. Como a dieta do salmão é muito variada, o salmão natural adquire uma enorme variedade de cores, desde branco ou um cor-de-rosa suave a um vermelho vivo. Permanece na água doce nos dois ou três primeiros anos de vida antes de ir para o mar. Suporta temperaturas baixas em água doce ou salgada. O salmão adulto é alimento de focas, ursos, tubarões, baleias e seres humanos.

O Chile vem como o segundo produtor mundial desse pescado, através dos anos sua indústria se desenvolveu e hoje é responsável por um abastecimento mundial considerável. FRENCH-DAVIS (2002b) destaca a importância da “Fundación” Chile, instituição semi pública voltada para assistência técnica a alguns projetos. A idéia era determinar quais

atividades poderiam se beneficiar de novas tecnologias. Como qualquer empreendimento de capital de risco, esta Fundação registrou muitos fracassos, mas também muitos casos de sucesso, como o cultivo de salmões (AGOSIN, 1999). A partir de um projeto piloto de 1981 para o cultivo de salmões em jaulas, em água doce (tecnologia desenvolvida na Noruega e Suécia), houve a primeira produção comercial em 1986-1987, duplicando no período seguinte. No ano de 1988 o ciclo se completou, quando o projeto começou a gerar lucros e a Fundação vendeu o projeto a uma companhia japonesa de pescados e mariscos comestíveis. Nos anos 1990 a exportação de salmão se tornou uma das mais importantes (CEPAL, 1998).

O Chile exportou para o Brasil US\$ 192 milhões, em 2009, sendo que 81% desse valor, num total de US\$ 156 milhões, foi da categoria salmão. Em volume, o produto também representou 81% do total importado do país, com 36 mil toneladas de um total de 44 mil toneladas importadas pelo país. Nota-se que quase 100% dos salmões importados têm sua origem no Chile (Tabela 1).

É interessante observar que houve um direcionamento das vendas de salmão e trutas ao mercado brasileiro quando ocorreu a crise internacional a partir de 2008. Segundo dados do Banco Central do Chile, o país exportou estes dois produtos para o mundo num total de US\$ 2.327.500.000 em 2008. Em 2009, houve um recuo para US\$ 2.029.400.000, representando um decréscimo de 13%. Paralelamente, o Brasil passou a importar mais deste país, chegando a 21%. Ou seja, a participação relativa brasileira nas compras do Chile foi aumentada em plena crise econômica internacional. Sem desconsiderar que houve um aumento de 10% no preço médio do pescado importado do Chile entre 2008 e 2009. Portanto, devido à estabilidade econômica brasileira, ao crescimento da renda média nacional e ao esforço exportador das empresas chilenas, o país apresentou um comportamento destoante dos demais compradores mundiais.

O consumo nacional de salmão em quilogramas teve aumento total de 16% em relação a 2008. Neste período apenas os salmões congelados, cuja participação relativa é a segunda em importância, tiveram suas compras aumentadas em 76%. Os salmões frescos, maior item da categoria, apresentaram redução de 2% na comparação com 2008. Os salmões defumados tiveram uma queda de 4% entre 2008 e 2009 (Tabela 1).

Nota-se que os salmões congelados tiveram aumento no volume e valor importados. Houve pequeno aumento de preço em comparação ao ano anterior, 7%. (BRASIL, 2009)

Tabela 1: Importações brasileiras de salmões nos anos 2008 e 2009.

Produtos	2008			2009			Δ		
	Kg	US\$	US\$/kg	Kg	US\$	US\$/kg	Kg	US\$	US\$/kg
Salmões Frescos	24.052.436	104.429.634,00	4,34	23.513.358	121.917.644,00	5,19	-2%	17%	19%
Salmões Congelados	7.137.611	17.758.566,00	2,49	12.577.251	33.507.209,00	2,66	76%	89%	7%
Salmões Defumados	74.068	898.029,00	12,12	71.283	861.349,00	12,08	-4%	-4%	-
<b>TOTAL</b>	<b>31.264.115</b>	<b>123.086.229,00</b>	<b>3,94</b>	<b>36.161.892</b>	<b>156.286.202,00</b>	<b>4,32</b>	<b>16%</b>	<b>27%</b>	<b>10%</b>

Tabela 1: Importações brasileiras de salmões nos anos 2008 e 2009. Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura - Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2008-2009

O Chile foi o principal fornecedor de pescado para o mercado brasileiro com 261 milhões de dólares em 2010. De acordo com dados do governo chileno, o Brasil foi o terceiro

destino das exportações chilenas de pescado com US\$ 247 milhões, cerca de 12% do total exportado em valores monetários. (BRASIL, 2010)

Países	2009		2010		% Δ	
	US\$	Kg	US\$	Kg	US\$	Kg
Chile	198.854.184	49.890.719	261.591.889	45.792.447	32%	-8%
Noruega	154.871.043	29.836.686	217.114.991	34.902.893	40%	17%
Argentina	148.524.547	62.282.066	167.851.069	63.154.695	13%	1%
China	27.654.900	7.811.045	96.980.332	33.339.691	251%	327%
Portugal	52.400.991	8.056.291	86.535.733	12.019.557	65%	49%
Marrocos	28.769.206	31.380.234	32.773.833	32.973.073	14%	5%
<b>Total</b>	<b>611.074.871</b>	<b>189.257.041</b>	<b>862.847.847</b>	<b>222.182.356</b>	<b>41%</b>	<b>17%</b>

Tabela 2: Principais Origens das Importações Brasileiras – 2009 e 2010 Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura - Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2010

O principal item de pescado importado pelo Brasil em 2010 foi o bacalhau (gênero *Gadus*), originário principalmente da Noruega, especialmente nas espécies *Gadus morhua* e *G. macrocephalus* (ambos em maior quantidade na forma salgado-seco), conforme. O segundo maior fornecedor de bacalhau para o Brasil é Portugal. O salmão cultivado segue como o segundo produto mais importado, sendo o Chile seu maior fornecedor. Esse país exporta também grandes quantidades de truta para o mercado brasileiro, além de outros pescados. (BRASIL, 2010)

Descrição	Especificações	Principais Origens	2009		2010	
			US\$	Kg	US\$	Kg
Salmões	Pacífico-Frescos	Chile	121.902.044	23.500.358	165.692.614	23.549.197
	Atlântico - Congelados		33.309.548	12.479.615	20.182.803	4.943.554

Tabela 3: Importação de Salmão pelo Brasil - 2009 e 2010. Fonte: Ministério da Pesca e Aquicultura - Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2010

Porém como o habitat natural do salmão são as águas europeias onde está presente sua alimentação em abundância em uma criação é preciso que se adicione um complemento à alimentação desse pescado, sendo assim uma alternativa usada para se chegar a uma coloração típica da carne é o uso da ATX, que já está presente de forma natural na alimentação dos peixes europeus.

No cultivo de peixes como a tilápia vermelha e de crustáceos, a ATX é comumente adicionada à ração animal para compensar a falta da ocorrência natural deste pigmento. Além de promover a pigmentação, o crescimento e a sobrevivência dos animais cultivados, este pigmento também estimula o sistema imunológico de trutas. No entanto, o estímulo não é suficiente para que a ATX seja incluída como um agente imuno-estimulante nas formulações alimentares (OGAWA et al, 2007).

Os ovos de galinha são uma rica fonte de nutrientes vitais e, por isso, são comumente usados na alimentação humana. O grau de pigmentação das gemas de ovos depende basicamente do desejo do consumidor e varia com a área geográfica, tradição e cultura. Em muitas áreas de mercado ao redor do mundo, consumidores e indústrias que produzem alimentos contendo ovos em sua formulação (maionese, misturas para bolos, produtos de

confeitaria, massas, e outros) preferem gemas de ovos fortemente coloridas, sendo difícil resistir ou ignorar essa tendência cultural e comercial (AKIBA et al., 2001; BAUERNFEIND, 1972; EL BOUSHY & RATERINK, 1992; MARUSICH; BAUERNFEIND, 1981; PONSANO et al., 2002; WILLIAMS, 1992).

Em geral, o uso de rações ricas em carotenóides, ou de suplementos carotenóides na ração, efetivamente mantém ou aumenta a coloração onde carotenóides são limitantes. Estas práticas têm se tornado o principal meio de conseguir a coloração desejada em vários produtos de origem animal, incluindo gemas de ovos (HUDON, 1994).

AKIBA e colaboradores (2001) conduziram dois experimentos para avaliar o potencial pigmentante da gema de ovos com *Phaffia rhodozyma*, uma levedura contendo altos teores de oxicarotenóides em comparação com a páprica, uma fonte pigmentante de ocorrência natural, e os resultados mostraram que a levedura pode ser uma fonte útil para o propósito almejado.

ATX natural derivada de *Haematococcus* tem sido usado com sucesso como pigmento paragemas de ovos. Galinhas White Leghorn foram alimentadas com uma dieta basal durante duas semanas para esgotar seus níveis de carotenóides; no momento do início do experimento, obtendo ovos com uma média de pontuação de 4 cores no indicador ou tabela decores Roche. Novas dietas foram então preparadas que foram suplementadas com 0,5; 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0 mg.kg<sup>-1</sup> de ATX a partir de homogeneizado de *Haematococcus*, que foram fornecidas aos animais por um período de quatro semanas. Após cerca de sete dias, os pigmentos de gema de ovo atingiram pontuações estáveis de 5,8; 7,9; 9,4; 10,1 e 11,8 na escala de cores, obtidas de galinhas alimentadas com rações suplementadas com 0,5; 1,0, 1,5, 2,0 e 3,0 mg.kg<sup>-1</sup> de ATX, respectivamente. As pontuações de cor foram correlacionadas com um aumento de concentrações de ATX, zeaxantina e luteína em gemas (LORENZ & CYSEWSKI, 2000).

*All Trans*-ATX foi detectada nos músculos (0,1 a 0,3  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) e fígado (0,3-1,1 mg.g<sup>-1</sup>) de frangos alimentados pela levedura, *Phaffia rhodozyma*, mas não em frangos de controle, a concentração de *all trans*-ATX subiu parcialmente na proporção da concentração da ATX na dieta. O valor da cor da carne do peito foi intensificada com o aumento da ATX na dieta, embora este resultado não fosse estatisticamente significativo. Enquanto a ATX é parcialmente metabolizada para idoxantina e crustaxantina, no fígado de galinha,  provável que a pigmentação da carne é principalmente devido a ATX, que é diretamente incorporada na carne. A função biológica de carotenóides tem recebido uma atenção significativa nos últimos anos. A ATX mostra uma maior atividade antioxidante e propriedades imuno-moduladoras em tecidos animais. ATX depositada (0,1 a 1,1  $\mu\text{g.g}^{-1}$ ) em tecidos pode ser de interesse em termos da prevenção da peroxidação do tecido em carne de galinha e, desse modo, poderia ser uma fonte de alimentação para consumo humano, que também tenha uma função adicional biológica (AKIBA et al., 2001).

Há uma quantidade crescente de evidências que sugerem que a ATX supera os benefícios antioxidantes do  $\beta$ -caroteno, zeaxantina, cantaxantina, vitamina C e vitamina E. Também têm demonstrado que a ATX pode proteger a pele dos efeitos nocivos da radiação ultravioleta, relacionada com a idade e degeneração macular, proteger contra cânceres induzidos quimicamente, aumentar lipoproteínas de alta densidade e melhorar o sistema imunitário. Estudos epidemiológicos têm demonstrado uma correlação entre o aumento de ingestão de carotenóides e redução da incidência de doença cardíaca coronária e certos tipos de câncer, degeneração macular e aumento de resistência a infecções virais, bacterianas, fúngicas e parasitárias. Estudos indicam que o mecanismo para esta proteção  um atributo, em parte, devido ao aumento direto a resposta imune pelos carotenóides. Efeitos anti carcinognicos dos carotenóides são susceptíveis de serem atribuíveis ao seu efeito

antioxidante, de modo como os radicais livres de oxigênio estão relacionados com o processo de iniciação e propagação de cancer (LORENZ & CYSEWSKI, 2000).

## 2.2 Avaliação toxicológica da ATX

A toxicologia de alimentos pode ser definida como “Ciência que estuda a natureza, fontes e formação de substâncias tóxicas em alimentos, incluindo a verificação de efeitos nocivos eo estabelecimento de limites de segurança para ingestão de determinados componetes”. (Torres, 2001)

Vários alimentos, regularmente consumidos, contêm substâncias químicas diversas que são consideradas tóxicas. Algumas podem ser letais, outras interferem na digestibilidade, absorção ou utilização de nutrientes, afetando q qualidade do alimentos. Há ainda, aquelas substâncias adicionadas aos alimentos, conhecidas por “aditivos alimentares”, entre eles, corantes, conservantes, antioxidantes, adulcorantes, que são todas substâncias ou misturas de sibstâncias dotadas ou não de valor nutritivo, adicionadas ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor e sabor, nmodificar ou manter seu estado físico geral ou exercer ação qualquer exigida para uma boa tecnologia de fabricação. (MIDIO & MARTINS, 2000)

O ponto principal para a segurança alimentar é a realização de testes de qualidade com rigor científico para apontar os limites mínimos e máximos de ingestão segura, de uma determinada substância química. Uma substância é considerada tóxica quando introduzida no organismo e absorvida, causa efeitos considerados nocivos ao sistema biológico; é considerada mutagênica quando induz alterações no material genético nuclear ou extra-nuclear de células germinativas e somáticas.

Os agentes genotóxicos são caracterizados por possuírem atividade biológica direta ou indireta, a partir de seus metabólitos, capazes de alterar informações codificadas no ADN. A genotoxicidade ocorre quando a exposição a um agente tóxico leva a alteração da estrutura ou do número de cromossomos (clatogenicidade/aneugenicidade) ou da sequência de pares de bases do ADN (mutagenicidade) (MCGREGOR, 2000).

O efeito protetor da ATX também pode ser mostrado no estudo que avaliou a relação de toxicidade induzida pela ciclofosfamida, em células geminais de camundongos machos, foram avaliados o peso corporal, peso dos testículos e epidídimo, a contagem de espermatozóide, morfologia da cabeça do espermatozóide, ensaio cometa do espermatozóide, histologia dos testículos e ensaio TUNEL. O tratamento com ATX . O tratamento com ATX na dose de 25 mg/Kg, por via oral, por cinco dias consecutivos, durante cinco semanas, e a CP foi administrada intraperitoniamente(ip) atravez de doses em uma faixa de 50 a 200 mg/ kg de peso, uma vez por semana, por cinco semanas. A ATX melhorou significativamente o peso dos testículos, a contagem de espermatozóides e morfologia espermática da cabeça em comparação com apenas ciclofosfamida nos animais tratados. O resultado do ensaio cometa mostrou que o tratamento com ATX significativamente restaurou o dano ao ADN do esperma induzido pela ciclofosfamida. Além disso, o tratamento com ATX mostrou proteção em relação a toxicidade testicular induzida pela ciclofosfamida, como é evidente a partir de testes histologicos e ensaio de TUNEL. Os presentes resultados indicam que a ATX monstrou um efeito potencial na quimioprevenção em relação a citotoxicidade e genotoxicidade da ciclofosfamida em células germinativas de camundongos (TRIPATHI & JENA, 2008).

## 2.2 Ensaio Cometa

Para a seleção da faixa de concentrações da substância a ser testada no ensaio Cometa deve ser realizado inicialmente, o ensaio para a avaliação de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio. Deve-se evitar no ensaio Cometa concentrações da substância que determinem valores superiores a 30% de decréscimo de viabilidade celular quando comparadas às culturas controle. (SPEIT & HARTMANN SPEIT, 1997)

O Ensaio de genotoxicidade SCG ou Cometa é um teste sensível, que detecta quebras de fita de ADN em células individuais. Possui custo relativamente baixo, rapidez, precisão e reprodutibilidade. Qualquer tipo celular pode ser avaliado, e uma das características importantes do ensaio é o emprego de pequena quantidade de células. O desenvolvimento da técnica se deve principalmente pela metodologia de eletroforese do ADN em micro-gel; e de Singh e colaboradores (1988), que lhe atribuíram maior sensibilidade através do uso de solução alcalina.

O ensaio Cometa se baseia em uma técnica eletroforética em microgel. As células são embebidas em gel de agarose em lâminas para microscopia que posteriormente são lisadas, submetidas à eletroforese em condições alcalinas e coradas com um corante fluorescente que se liga ao ADN. As células que apresentam danos crescentes no ADN mostram migração aumentada de ADN cromossômico do núcleo em direção ao anodo, que se assemelha à forma de um cometa. A extensão de migração do ADN indica a quantidade de quebras de ADN na célula. (POP N° 65.3330.011, 2012).

O teste do cometa é utilizado para detectar lesões genômicas, que após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Uma vez que danos no ADN são frequentemente célula e tecido específicos, uma metodologia como o teste do cometa que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é de extrema relevância para a avaliação de substâncias genotóxicas (TICE, 1995).

As etapas envolvidas na realização do teste Cometa consistem na lise celular, relaxamento e eletroforese do ADN. Os fragmentos provenientes das quebras das fitas de ADN causadas pelo agente xenobiótico ao serem submetidos à eletroforese “migram” formando uma cauda semelhante a de um cometa. Após coloração com o brometo de etídio, o dano ao ADN é avaliado de acordo com o tamanho da cauda dos cometas em 4 diferentes classes (0a 3): classe 0 (ausência de cauda), classe 1 (pequena cauda); classe 2 (grande cauda); classe 3 (ADN totalmente danificado com a cabeça do cometa muito pequena com praticamente todo o ADN na cauda. Deve-se ter em mente que não existe célula sem dano no ADN, visto que o próprio metabolismo celular pode gerar em torno de 1000 lesões diárias no ADN/célula. O que se faz, rotineiramente é modular as condições técnicas (tempo de relaxamento e eletroforese) para que um mínimo de ADN migre da cabeça para a cauda do cometa nos controles negativos (TICE, 1995).

### 3. OBJETIVO

#### 3.1 Objetivo Geral

- Avaliar a genotoxicidade e a antigenotoxicidade da ATX

#### 3.2 Objetivos Específicos

- Realizar o ensaio Cometa da ATX em células sanguíneas humanas *in vitro*
- Realizar o ensaio Cometa do peróxido de hidrogênio em células sanguíneas humanas *in vitro*
- Realizar o ensaio Cometa da ATX na presença de um agente genotóxico oxidante (peróxido de hidrogênio) em células sanguíneas humanas *in vitro*.

### 4. JUSTIFICATIVA

Segundo a legislação brasileira (BRASIL, 1999), a comprovação da segurança de alimentos e de ingredientes é realizada a partir da avaliação das informações encaminhadas pelas empresas a respeito da finalidade e das condições de uso do alimento ou ingrediente e sua respectiva avaliação de risco. A avaliação de risco, que deve seguir critérios científicos, é um processo estruturado e sistemático composto por quatro fases: identificação do perigo, caracterização do perigo, avaliação da exposição e caracterização do risco (ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE, 2008)

Sendo assim como a ATX é um aditivo muito empregado na alimentação de salmão criado em cativeiro, no Chile e, sabendo que o Brasil não possui clima apropriado para esse cultivo, mas é um consumidor dessa produção, precisamos saber até que ponto esse aditivo interfere de modo positivo ou negativo na nossa alimentação. Já que se ele se incorpora ao músculo do pescado e nós o consumimos, precisamos pesquisar se em níveis elevados repassa algum efeito benéfico ou deletério para nossas células e assim sendo passa estar trazendo conseqüências para nossa saúde como um todo.

Em relação à experimentação animal, pode-se afirmar que um movimento de controle sobre o uso de animais tem sido crescente, paralelo e comparável aquele das pesquisas envolvendo seres humanos. O debate ético sobre o uso de animais tem atraído a atenção da sociedade, com diferentes visões sobre o assunto, embora não seja propriamente um debate novo. Após os anos 70 para harmonizar os ensaios biológicos *in vivo* foi estabelecida a partir da regra dos 3Rs da experimentação animal, tal como se tornaram amplamente conhecidos os princípios propostos por Russel e Burch em 1959. O princípio dos 3Rs – *Refinement, Reduction e Replacement* – recomendam desde o refinamento das metodologias para torná-las menos lesivas aos animais de experimentação, também uma redução do número de animais nos experimentos, ou até mesmo a substituição de ensaios *in vivo* pelos *in vitros*. Estas recomendações se tornaram diretrizes para o controle da experimentação animal em diversos países=(SCHATZMAYR; MÜLLER, 2008).

Estudos toxicológicos são especialmente relevantes para auxiliar na comprovação da segurança de alimentos e ingredientes, pois contribuem para (1)-a identificação de efeitos adversos potenciais, (2) definição das condições de exposição necessárias para produzir tais efeitos, (3) avaliação da relação dose-resposta para os efeitos adversos, incluindo a definição das doses que não produzem tais efeitos, (4) interpretação dos dados experimentais para fins de avaliação de risco, tais como, as informações sobre o modo de ação e sua relevância para

humanos e dados sobre metabolismo e toxicocinética, com a extrapolação dos resultados de animais para os homens. De maneira geral, os estudos toxicológicos são necessários para a caracterização do perigo de substâncias químicas, ou quando a informação disponível, a partir de outras evidências, é insuficiente para garantir a segurança de uso do produto.

A avaliação toxicológica deverá contemplar dados de estudos de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* e de estudos de toxicidade subcrônica. Estudos toxicológicos adicionais podem ser necessários em função dos resultados dos estudos iniciais e de outras informações específicas. Se houver indício de possíveis efeitos em longo prazo, devem ser realizados estudos complementares referentes à toxicidade crônica, carcinogenicidade, toxicidade sobre a reprodução e desenvolvimento e, eventualmente, neurotoxicidade, imunotoxicidade e alergenicidade. Os estudos toxicológicos devem ser realizados de acordo com as diretrizes publicadas em referências internacionais existentes.

O trabalho se enquadra perfeitamente na regra dos 3Rs, pois estudamos a citotoxicidade, a genotoxicidade da ATX, bem como a antigenotoxicidade de ATX na indução de dano oxidativo ao ADN pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células sanguíneas humanas *in vitro*.

A principal discussão sobre o emprego de aditivos na produção de alimentos resulta da controvérsia entre a necessidade e a segurança de seu uso. Embora sob o ponto de vista tecnológico haja benefícios alcançados com a utilização de aditivos alimentares, existe a preocupação constante quanto aos riscos toxicológicos potenciais decorrentes da ingestão diária dessas substâncias químicas.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

O ensaio Cometa em condições alcalinas, introduzido por Singh e colaboradores em 1988, é uma técnica eletroforética sensível, reproduzível, simples e rápida para a detecção da presença de quebras de fita única de ADN e de lesões em sítios álcali-sensíveis em células de mamífero. Através deste ensaio é possível a avaliação de dano ao ADN em células de mamífero proliferantes e não proliferantes a nível individual, a detecção de diferenças intercelulares e o emprego de amostras celulares extremamente pequenas (TICE et al, 2000). Tem amplas aplicações em toxicologia genética em testes de genotoxicidade *in vitro* (WITTE et al, 2007), *in vivo* (S.BRENDLER-SCHWAAB et al, 2005), no biomonitoramento ambiental e monitoramento populacional humano (DUSINKA; COLLINS, 2008). O ensaio tem sido empregado no estudo de células sanguíneas humanas quanto à suscetibilidade à radiação e a substâncias químicas mutagênicas (GEDIK et al., 1992; VIJAYALAXMI et al., 1992).

### 5.1 Padrões Analíticos e Reagentes

- ATX - (3,3'-dihidroxi-beta,beta-caroteno-4,4'-diona) pureza mínima 98% Santa Cruz
- Peróxido de Hidrogênio – 30 % - 32 % - Vetec

### 5.2 Insumos e soluções do Ensaio Cometa

- Células sanguínea humanas heparinizadas obtidas por punção venosa;
- Hidróxido de sódio procedência: Merck;
- Sal dissódico do ácido tetra-acéticoetilenodiamino(EDTA) dissódico procedência: Isofar ( PM: 372,24);
- Tris base – Tris(hidroximetil)-aminometano- procedência: Merck;

- Triton X-100 - (t-octilfenoxipolietoxi etano) – procedência: Merck;
- Dimetilsulfóxido – 99,5% (DMSO): procedência: Sigma;
- Etanol Absoluto (99,2 a 99,5%) – procedência: Merck;
- Agarose de baixo ponto de fusão – procedência: Sigma;
- Agarose de ponto de fusão normal - Agarose MEE0 – Roth;
- Sarcosinato de lauroilo sódico – Sigma —; PM:293,4;
- Solução de heparina sódica 5000 UI/mL - Lique mine®;
- Solução salina tamponada de fosfato sem cálcio e magnésio(PBS) (Anexo A)
- Solução tampão alcalina para eletroforese (NaOH 300 mM /EDTA 1 mM) (Anexo A);
- Solução de lise (Anexo A);
- Solução tampão para neutralização TRIS 0,4 M (Anexo A);
- Solução corante de brometo de etídio ( $200 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )(brometo de 3,8-diamino-5-etil-6-fenilfenantridínio), procedência: Sigma (Anexo A);
- Solução corante de diacetato de fluoresceína (concentração de  $5\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ )– Sigma (Anexo A)
- Solução de Metil Metano Sulfonado (MMS) – na concentração de  $800 \mu\text{M}$ , procedência: Aldrich. (Anexo A).

### 5.3 Equipamentos e Outros itens

- Balança analítica;
- Banho-maria ( $37 \pm 1^\circ\text{C}$ ) e ( $60 \pm 1^\circ\text{C}$ );
- Microondas;
- Capela química
- Estufa de cultura;
- Fluxo laminar vertical;
- Tubos de microcentrífuga tipo Eppendorf de 1,5 mL
- Cuba horizontal de eletroforese e fonte para a eletroforese (Bio-Rad DNA Sub Cell);
- Microscópio de fluorescência (Nikon);
- Lâminas para microscopia com uma das extremidades fosca e lamínulas (24 x 60 mm).

### 5.4 Ensaio Cometa da ATX:

#### 5.4.1 – Citotoxicidade da ATX

Em cada ensaio foi empregado um grupo controle (sem tratamento), controle solvente (DMSO 5%), e o controle positivo MMS  $160 \mu\text{M}$  além das concentrações da ATX.

Em tubo de microcentrífuga  $285 \mu\text{L}$  de sangue total foram tratados com  $15 \mu\text{L}$  de DMSO ou com  $15 \mu\text{L}$  das 10 diferentes soluções de ATX em DMSO nas seguintes concentrações:  $2 \mu\text{M}$ ,  $20 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $200 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$ ,  $1000 \mu\text{M}$ ,  $2000 \mu\text{M}$ ,  $5000 \mu\text{M}$ ,  $10000$ ,  $20000 \mu\text{M}$  resultando nas concentrações finais de: 5% de DMSO de  $0,1 \mu\text{M}$ ,  $1 \mu\text{M}$ ,  $5 \mu\text{M}$ ,  $10 \mu\text{M}$ ,  $12,5 \mu\text{M}$ ,  $25 \mu\text{M}$ ,  $50 \mu\text{M}$ ,  $100 \mu\text{M}$ ,  $200 \mu\text{M}$ ,  $250 \mu\text{M}$ ,  $400 \mu\text{M}$ ,  $500 \mu\text{M}$  e  $1.000 \mu\text{M}$  de ATX. Para o controle positivo  $200 \mu\text{L}$  de sangue total foram tratados com  $50 \mu\text{L}$  de

solução de MMS 800  $\mu\text{M}$  resultando na concentração final de MMS 160  $\mu\text{M}$ . As células foram tratadas e incubadas em estufa a 37°C durante 2 h. Após o período de tratamento realizou-se o ensaio de viabilidade celular adicionando-se 50  $\mu\text{L}$  de suspensão celular de cada cultura controle ou de cada cultura tratada pela ATX a 50  $\mu\text{L}$  da solução de corante, diacetato de fluoresceína (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e brometo de etídio (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) de acordo com o descrito por Hatmann & Speit, (1997). Foram analisadas em microscópio de fluorescência 200 células por lâmina e por concentração a um aumento de 400 X. As células viáveis mostram fluorescência verde enquanto núcleos corados em laranja indicam células mortas. O resultado foi expresso como percentual de citotoxicidade ou percentual de células mortas.

A partir dos resultados deste ensaio escolhemos as concentrações de ATX que foram usadas no ensaio Cometa, pois segundo Anderson e colaboradores (1999), devemos evitar no ensaio Cometa concentrações da substância-teste que cause valores de decréscimo da viabilidade celular superiores a 30% quando comparado à cultura controle solvente.

#### 5.4.2 Ensaio Cometa da ATX

O ensaio Cometa em células sanguíneas humanas foi realizado de acordo com o Procedimento Operacional Padronizado (POP) nº 65.3330.011 referente ao ensaio Cometa do INCQS (INSTITUTO NACIONAL DE CONTROLE DE QUALIDADE EM SAÚDE, 2012). O POP foi baseado em diretrizes estabelecidas por Speit e Hartmann, (2006) e Tice e colaboradores (2000) a partir do trabalho original de Singh e colaboradores (1988) e das modificações introduzidas por Olive (1989) e Klaude e colaboradores em 1996. Dois ensaios Cometa independentes foram realizados para a ATX. Na Figura 3 abaixo, as etapas de realização do ensaio Cometa.

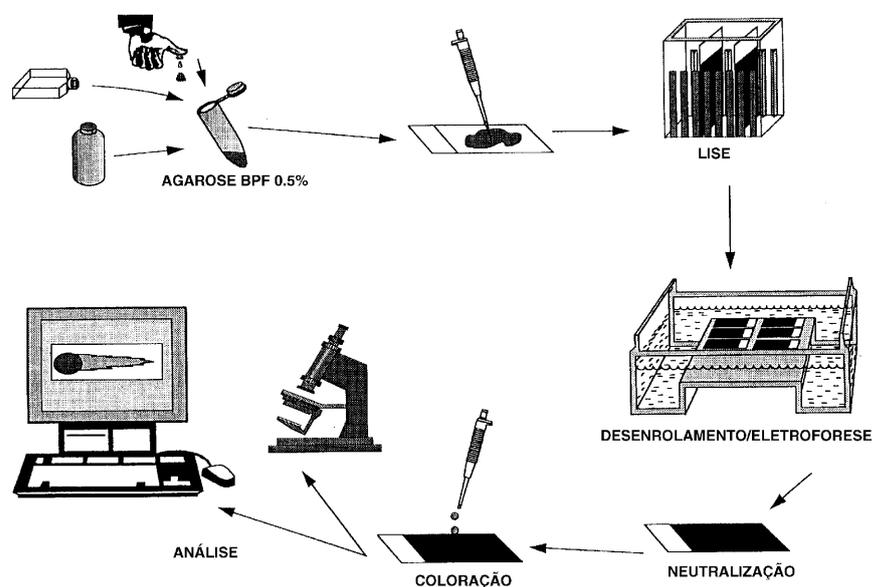


Figura 3: Esquema das etapas do ensaio Fonte: SPEIT & HARTMANN, 1997

#### 5.4.2.1 Preparação das agaroses de baixo ponto de fusão e de ponto de fusão normal

##### a) Preparação da agarose de baixo ponto de fusão (agarose BPF)

- Preparou-se a agarose BPF na concentração de 0,5% m/v. Dissolveu-se 0,1g de agarose em 20 mL de PBS pelo aquecimento com bico de Bunsen a uma temperatura próxima a da ebulição até a completa solubilização da agarose. Em seguida a agarose BPF foi distribuída em volumes de 5 mL em erlenmeyer de 25 mL e guardados na geladeira até o momento do uso; No momento do uso, aqueceu-se rapidamente a agarose até a sua completa dissolução. A agarose BPF foi resfriada colocando-a em banho-maria a 37°C até o momento do uso.

##### b) Preparação da agarose de ponto de fusão normal (agarose PFN)

- A solução de agarose PFN 1,5 % m/v foi preparada em solução PBS. Para 200 lâminas, adicionou-se 6 g de agarose a 400 mL de solução PBS e aqueceu-se com o auxílio de bico de Bunsen a uma temperatura próxima à ebulição até a sua dissolução. A agarose PFN foi fervida três vezes antes do uso no experimento.

#### 5.4.2.2 Preparação das lâminas

##### a) Preparação da camada inferior de agarose

a) Limpou-se as lâminas de microscopia com lenço de papel embebido em etanol absoluto;

b) As lâminas limpas foram mergulhadas verticalmente, por pouco tempo, na agarose de PFN quente, mantida em banho-maria a uma temperatura de 60°C. A agarose deve alcançar até a metade da parte fosca da lâmina para assegurar que a mesma fique aderida adequadamente à lâmina;

c) Enxugou-se o lado posterior da lâmina e colocou-a rapidamente sobre a estante na posição horizontal. Essa etapa deve ser realizada rapidamente para que se possa garantir uma boa distribuição da agarose;

d) Deixou-se as lâminas secarem à temperatura ambiente durante a noite;

e) Armazenou-se as lâminas em caixas à temperatura ambiente por tempos prolongados (um ano) até o dia do uso.

#### 5.4.2.3 Preparação e tratamento das células (sangue total humano)

a) Cinco mL de sangue foram obtidos por punção venosa empregando-se seringa de 5 mL com 400 µL de solução de heparina 5.000 UI/m;

b) As concentrações finais de ATX foram de 0,1 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM, 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 250 µM, 400 µM, 500 µM e 1.000 µM o tratamento das células foi feito durante 2h a 37°C em estufa;

c) Após o período de tratamento, em tubo de microcentrífuga, misturar 5 µL de sangue total tratado com 120 µL de agarose de baixo ponto de fusão (agarose BPF) mantida a 37°C no banho-maria. Feita a homogeneização foi adicionada 120 µL a cada lâmina.

#### 5.4.2.4 Preparação da segunda camada de agarose e lise celular

- a) Após o período de tratamento, em tubo de microcentrífuga foi misturado 5  $\mu\text{L}$  de sangue total tratado com 120  $\mu\text{L}$  de agarose BPF mantida a 37°C no banho-maria;
- b) Em seguida é feita a homogeneização para uma completa distribuição das células em agarose BPF;
- c) Foi adicionado 120  $\mu\text{L}$  da mistura sobre a lâmina previamente revestida pela agarose PFN;
- d) Imediatamente após, colocou-se lamínula sobre a lâmina, com cuidado para evitar a formação de bolhas de ar;
- e) Colocou-se na geladeira (4°C a 10°C) as lâminas em estantes por aproximadamente cinco minutos, até que a camada de agarose endurecesse;
- f) Removeu-se a lamínula, deslizando-a delicadamente sobre a camada de agarose e logo em seguida, mergulhou-se lentamente a lâmina em recipiente contendo solução para lise celular gelada, recentemente preparada e protegida da luz;
- g) As lâminas foram mantidas em geladeira (4°C a 10°C) durante pelo menos 1h;
- h) Preparou-se 2 lâminas para cada grupo experimental.

#### Notas:

1. Realizou-se as etapas descritas nos itens **5.4.2.2** e **5.4.2.3** com a luz do laboratório apagada para evitar danos adicionais ao ADN;
2. Empregou volume de suspensão celular de 5  $\mu\text{L}$ ; não se deve usar volume superior a 10  $\mu\text{L}$ ;
3. Ao se empregar suspensão celular com 10.000 células em 5  $\mu\text{L}$  a 10  $\mu\text{L}$  teremos 1 célula por campo microscópio no aumento de 250 x;
4. Cobriu-se a tampa e o recipiente contendo a solução de lise com folha de papel de alumínio para proteger as lâminas da exposição à luz;
5. As lâminas podem ser mantidas em solução de lise gelada por períodos de tempo longos, porém não superiores a quatro semanas;
6. Enxaguou-se as lâminas cuidadosamente com água destilada antes da eletroforese, quando for observada precipitação da solução de lise.

#### 5.4.2.5 Desenrolamento e Eletroforese do ADN.

- a) A cuba de eletroforese horizontal foi colocada em recipiente plástico com 4,6 L de água previamente resfriada em geladeira durante aproximadamente 4 h. Colocou-se também

junto à cuba, quatro bolsas plásticas de gelo reciclável do tipo termogel que foram mantidas no congelador durante cerca de 12 h para solidificação;

- b) Depois de aproximadamente uma hora em geladeira (4°C a 10°C), removeu-se delicadamente as lâminas da solução de lise;
- c) Em seguida, a fonte foi ligada e ajustada em 25 volts e à corrente de 300 mA;
- d) Retirou-se o excesso de solução de lise das bordas e da parte de trás das lâminas;
- e) Colocou-se as lâminas no suporte da cuba de eletroforese próxima ao polo positivo (anodo), o mais próximo possível umas das outras e completou-se os espaços vagos com lâminas de vidro sem agarose;
- f) Distribuiu-se aleatoriamente as duas lâminas do mesmo grupo experimental;
- g) Encheu-se lentamente a cuba com 1320 mL de tampão alcalino fresco para eletroforese, previamente resfriado em geladeira durante pelo menos 2 h, até que o nível do líquido cubra completamente as lâminas e evitando-se a formação de bolhas sobre a agarose;
- h) As lâminas foram mantidas em tampão alcalino por 20 min, para permitir o desenrolamento do ADN e a expressão das diferentes classes de dano ao ADN sensíveis ao tratamento alcalino;
- i) Em seguida, após a conexão dos cabos da cuba com a fonte ajustou-se a corrente na faixa de 289 a 295 mA aumentando ou diminuindo-se lentamente o nível do tampão, realizando-se a corrida eletroforética durante 20 min;
- j) ao final da corrida eletroforética, desligou-se a fonte.

#### **Notas:**

1. Realizou-se todas as etapas do item **5.4.2.4** com a luz do laboratório apagada;
2. No ajuste final da corrente pela adição ou retirada de tampão da cuba, é essencial o ajuste da corrente a 25 V e satisfatório a geração de uma corrente de 289 mA a 295 mA, pois durante a eletroforese há uma tendência para o aumento a 300 mA.

#### **5.4.2.6 Neutralização e coloração das lâminas**

- a) Ao término da corrida eletroforética, retirou-se cuidadosamente as lâminas do tampão alcalino colocando-as sobre o suporte para coloração;
- b) Gota a gota cobriu-se totalmente as lâminas com tampão para neutralização e esperou-se pelo menos 5 minutos, fazendo isso por mais duas vezes;
- c) A fixação foi realizada com o uso do etanol absoluto (99,2% a 99,5%) por 10 min, e em seguida deixou-se as lâminas secarem na posição horizontal à temperatura ambiente de um dia para o outro. As lâminas foram mantidas em geladeira e coradas no momento desejado seguindo a técnica usual

d) Para corar, adicionou-se 30  $\mu\text{L}$  de solução de brometo de etídio (20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) à lâmina e cobriu-se com uma lamínula.

Notas:

1. As lâminas coradas (uma a uma) devem ser avaliadas imediatamente;
2. Lâminas coradas já analisadas podem ser lavadas ligeiramente com água destilada para remoção da lamínula, em seguida deixar que se sequem e corá-las posteriormente para reavaliação.

#### 5.4.2.7 Avaliação microscópica

- a) Analisou-se as lâminas, com ADN corado pelo brometo de etídio, em microscópio de fluorescência a um aumento de 400 X;
- b) Selecionou-se ao acaso 50 células por lâmina para análise;
- c) Avaliou-se a extensão de migração do ADN em 100 células (2 lâminas) de acordo com a intensidade da cauda dos cometas em 4 diferentes classes (0 a 3), da seguinte forma:
  - classe 0: ausência de cauda;
  - classe 1: pequena cauda;
  - classe 2: grande cauda;
  - classe 3: totalmente danificado (cabeça do cometa muito pequena, com praticamente todo o ADN na cauda).
- d) Utilizou-se o formulário apropriado durante a análise microscópica;
- e) Expressou-se o dano ao ADN em percentagem de células nas quatro diferentes classes conforme Figura 4, e em unidades arbitrárias (*UA*) em formulário adequado.

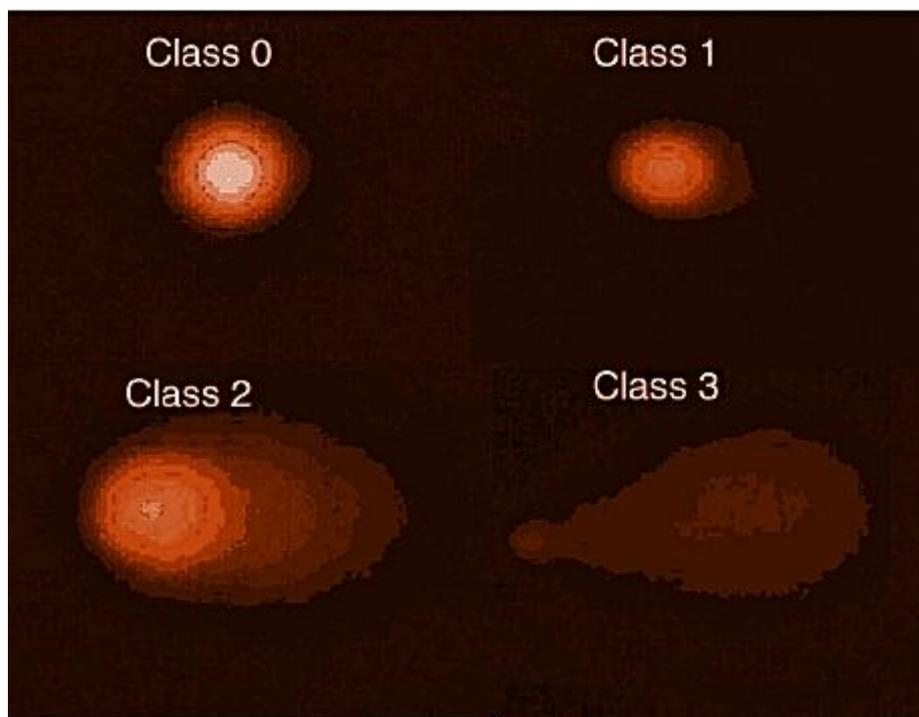


Figura 4: Classe 0: sem dano ao ADN/sem migração – cauda do cometa ausente; Classe 1: pequeno dano ao ADN/discreta migração – formação de uma pequena cauda do cometa; Classe 2: médio dano ao ADN/Moderada migração – formação de uma grande cauda do cometa; Classe 3: alto dano ao ADN/elevada migração – formação da cauda do cometa totalmente formado e a definição da cabeça do cometa

## 5.5 - Ensaio Cometa do peróxido de hidrogênio

### 5.5.1 – Citotoxicidade do peróxido de hidrogênio

Em cada ensaio foram empregados um grupo controle (sem tratamento), controle solvente (PBS), e o controle positivo MMS 160  $\mu\text{M}$  além das concentrações do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ).

Em tubo de microcentrífuga foram tratados 200  $\mu\text{L}$  de sangue total com 50  $\mu\text{L}$  das diferentes soluções de  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas seguintes concentrações: 62,5  $\mu\text{M}$ , 125  $\mu\text{M}$ , 250  $\mu\text{M}$ , 500  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$ , 2000  $\mu\text{M}$ , 5000  $\mu\text{M}$  e 10000  $\mu\text{M}$  resultando nas concentrações finais de 12,5  $\mu\text{M}$ , 25  $\mu\text{M}$ , 50  $\mu\text{M}$ , 100  $\mu\text{M}$ , 200  $\mu\text{M}$ , 400  $\mu\text{M}$ , 1000  $\mu\text{M}$  e 2000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

As células foram tratadas com PBS e  $\text{H}_2\text{O}_2$  e incubadas em banho de gelo, durante o período de 10 min. Após o período de tratamento realizou-se o ensaio de viabilidade celular adicionando-se 50  $\mu\text{L}$  da suspensão celular de cada cultura controle-solvente ou tratada com  $\text{H}_2\text{O}_2$  a 50  $\mu\text{L}$  da solução de corante, Diacetato de Fluoresceína (30  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e brometo de etídio (8  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) como já descrito no ensaio de citotoxicidade da ATX.

A partir dos resultados deste ensaio de citotoxicidade, escolhemos as concentrações de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que foram usadas no ensaio Cometa, pois segundo Anderson e colaboradores (1999) e Henderson e colaboradores (1998), devemos evitar no ensaio Cometa concentrações da substância-teste que causem valores de decréscimo da viabilidade celular superiores a 30% quando comparado à cultura controle solvente.

## 5.5.2 Ensaio Cometa do peróxido de hidrogênio.

Dois ensaios Cometa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> independentes foram realizados.

### 5.5.2.1 Preparação das agaroses de PFN e de BPF

Realizada conforme 5.4.2.1

### 5.5.2.2 – Preparação das lâminas

Realizada conforme 5.4.2.2

### 5.5.2.3 Preparação e tratamento das células (sangue total humano)

- a) 5 mL de sangue foi obtido por punção venosa empregando seringa de 5 mL com 400 µL de solução de heparina 5.000 UI/mL;
- b) As concentrações finais de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram 12,5 µM, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 200 µM, 400 µM, 1000 µM e 2000 µM. O tratamento das células com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi realizado em banho de gelo durante 10 min. No caso do controle positivo, o tratamento com MMS 160 µM ocorreu durante 2h a 37°C.

### 5.5.2.4 Preparação da segunda camada de agarose e lise celular

Realizada conforme 5.4.2.4

### 5.5.2.5 Desenrolamento e eletroforese do ADN

Realizado conforme 5.4.2.5

### 5.5.2.6 Neutralização e coloração das lâminas

Realizada conforme **5.4.2.6**

### 5.5.2.7 Avaliação microscópica

Realizada conforme **5.4.2.7**

## **5.6 - Ensaio Cometa da combinação da ATX com peróxido de hidrogênio**

### 5.6.1 – Citotoxicidade da combinação

Em cada ensaio foram empregados um grupo controle sem tratamento prévio pela ATX, tratado somente com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM e 2000 µM, um controle-solvente (tratamento prévio com DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM e 2000 µM) e tratamento prévio com 5 diferentes concentrações de ATX, 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM e 500 µM combinados com H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM ou 2000 µM.

Em tubo de microcentrífuga foram tratados durante 2h a 37°C, 285 µL de sangue total, com 15 µL das soluções de ATX nas seguintes concentrações: 500 µM, 1000 µM, 2000 µM, 5000 µM e 10000 µM resultando nas concentrações finais de ATX de 25 µM, 50 µM, 100 µM, 250 µM e 500 µM. Imediatamente após o tratamento com ATX, adicionou-se ao volume de 300 µL do sangue pré-tratado, 75 µL das duas diferentes soluções de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 1000 µM ou

10000  $\mu\text{M}$  resultando nas concentrações finais de 200  $\mu\text{M}$  ou 2000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  que foram mantidos em banho de gelo por 10 min.

Imediatamente após o tratamento, realizou-se o ensaio de viabilidade celular mediado pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio de acordo com o descrito para o ensaio de citotoxicidade da ATX

A partir dos resultados deste ensaio de citotoxicidade, definimos as combinações de ATX e de  $\text{H}_2\text{O}_2$  a serem usadas no ensaio Cometa, pois segundo Anderson e colaboradores (1999) e Henderson e colaboradores (1998), devemos evitar no ensaio Cometa concentrações da combinação que causem valores de decréscimo da viabilidade celular superiores a 30% quando comparado à cultura controle solvente.

## 5.6.2 Ensaio Cometa da combinação da ATX com peróxido de hidrogênio

### 5.6.2.1 Preparação das agaroses de PFN e de BPF

Realizada conforme **5.4.2.1**

### 5.6.2.2 – Preparação das lâminas

Realizada conforme **5.4.2.2**

### 5.6.2.3 Preparação e tratamento das células (sangue total humano)

- a) 5 mL de sangue foi obtido por punção venosa empregando seringa de 5 mL com 400  $\mu\text{L}$  de solução de heparina 5.000 UI/mL;
- b) Em tubo de microcentrífuga foram tratados durante 2h a  $37^\circ\text{C}$ , 285  $\mu\text{L}$  de sangue total com 15  $\mu\text{L}$  de DMSO (controle-solvente) ou com as 5 diferentes concentrações da ATX . Imediatamente após o tratamento com o DMSO ou com ATX realizou-se o tratamento com  $\text{H}_2\text{O}_2$  200  $\mu\text{M}$  ou com 2000  $\mu\text{M}$  durante 10 min em banho de gelo conforme explicitado no ensaio de citotoxicidade da combinação em 5.6.1.

### 5.4.2.4 Preparação da segunda camada de agarose e lise celular

Realizada conforme 5.4.2.4

### 5.6.2.5 Desenrolamento e eletroforese do ADN

Realizado conforme 5.4.2.5

### 5.4.2.6 Neutralização e coloração das lâminas

Realizada conforme 5.4.2.6

### 5.4.2.7 Avaliação microscópica

Realizada conforme 5.4.2.7

## 6. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 6.1. Ensaio de citotoxicidade e Cometa da ATX

#### 6.1.1 Ensaio de viabilidade celular mediada pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio da ATX

A ATX, nas concentrações de 0,1 a 5  $\mu\text{M}$  em DMSO 5%, após período de tratamento de 2h a 37 °C, não foi citotóxica em células sanguíneas humanas quando comparada ao DMSO 5%, sendo citotóxica na faixa de 10 a 1000  $\mu\text{M}$  induzindo decréscimo de viabilidade celular de 1 a 10% quando comparado ao controle DMSO 5% (Tabela 4). As dez concentrações de ATX na faixa de 0,1 a 1000  $\mu\text{M}$  induziram, pois, níveis aceitáveis de citotoxicidade para serem empregadas no ensaio Cometa, ou seja, níveis abaixo de 30% quando comparados à cultura controle (DMSO 5%)

Desta forma, todas as concentrações de ATX foram empregadas no ensaio Cometa em células sanguíneas humanas, com exceção da concentração de 1000  $\mu\text{M}$  devido a sua não completa solubilização em DMSO.

**Tabela 4: Ensaio de citotoxicidade da astaxantina em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 2 h**

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controle	0
Controle-solvente (DMSO 5%)	6
Astaxantina ( $\mu\text{M}$ )	
0,1	4
1	5
5	6
10	8
25	16
50	12
100	16
250	16
500	12

### 6.1.2. Ensaio Cometa da ATX

As Tabelas 5 e 6 mostram os resultados individuais dos dois ensaios Cometa realizados com ATX em DMSO 5% empregando-se nove concentrações na faixa de 0,1 a 500  $\mu\text{M}$ . O controle positivo, MMS, mutágeno de ação direta, na concentração de 160 $\mu\text{M}$ , induziu efeito genotóxico bem evidente extremamente significativo em relação ao controle ( $p < 0,0001$ ) nos dois ensaios realizados. Os resultados de dano ao ADN expressos em UAT são mostrados na Tabela 5 e Figura 5 para o primeiro ensaio e na Tabela 6 e Figura 7 para o segundo ensaio. Adicionalmente, as Figuras 6 e 8 mostram para cada ensaio, a distribuição de dano ao ADN entre as células nas 4 diferentes classes para cada concentração de ATX, bem como, para os controles, DMSO 5% e MMS 160  $\mu\text{M}$ .

No primeiro e segundo ensaios, o tratamento pela ATX não induziu aumento significativo ( $p > 0,1$ ) na migração de ADN em todas as concentrações testadas, quando comparado ao DMSO 5%, com exceção da concentração de 1  $\mu\text{M}$  de ATX no primeiro ensaio com  $p > 0,05$  (Tabela 5, Figura 5; Tabela 6 e Figura 7)

**Tabela 5: Efeito de astaxantina em células sanguíneas humanas  
Primeiro ensaio**

EC- ATX 01	Classes de Dano no ADN (%)				U.A.T <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
Controle	87,5	9,0	3,0	0,5	33
Controle-solvente (DMSO 5%)	94,0	5,0	0,0	1,0	16
Astaxantina (µM)					
0,1	96,0	3,5	0,0	0,5	10
1	98,5	1,5	0,0	0,0	3
5	92,0	8,0	0,0	0,0	16
10	93,0	3,0	1,0	3,0	28
25	94,0	3,0	0,5	2,5	23
50	93,5	6,0	0,0	0,5	15
100	92,5	6,5	0,5	0,5	18
250	90,0	9,5	0,5	0,0	21
500	88,0	10,5	1,5	0,0	27
Positivo MMS <sup>2</sup> 160 µM	0,0	1,5	13,5	85,0	567***

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano.

\*\*\*Diferença extremamente significativa ( $p < 0,0001$ ) em relação ao controle pelo teste t de Student.

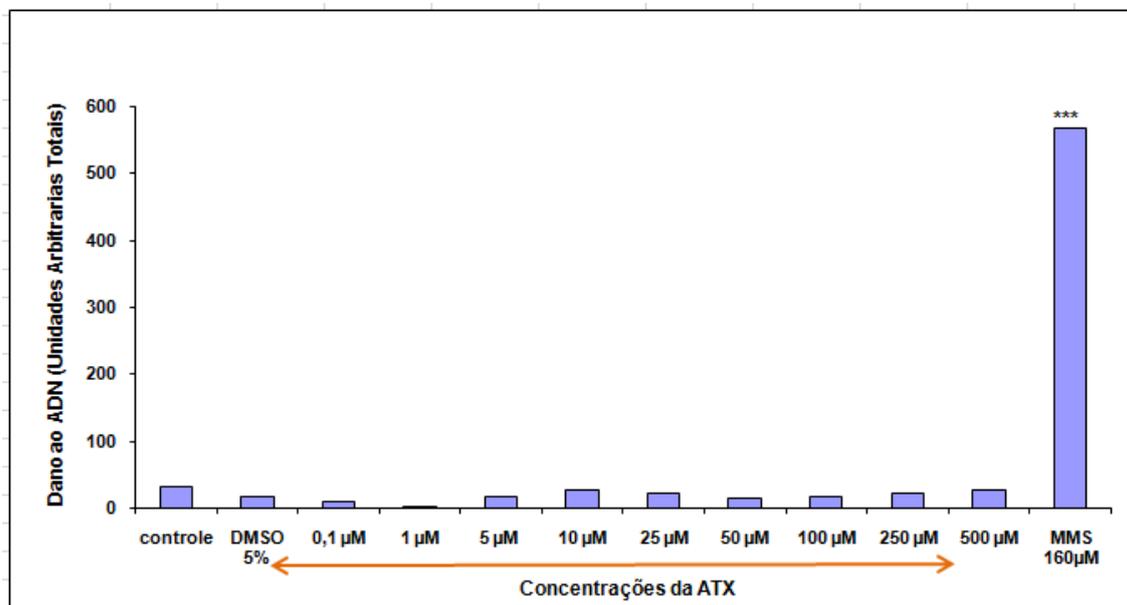


Figura 5: Efeito da astaxantina (ATX) em células sanguíneas humanas *in vitro*  
Primeiro ensaio Cometa (tratamento: 2h a 37°C)

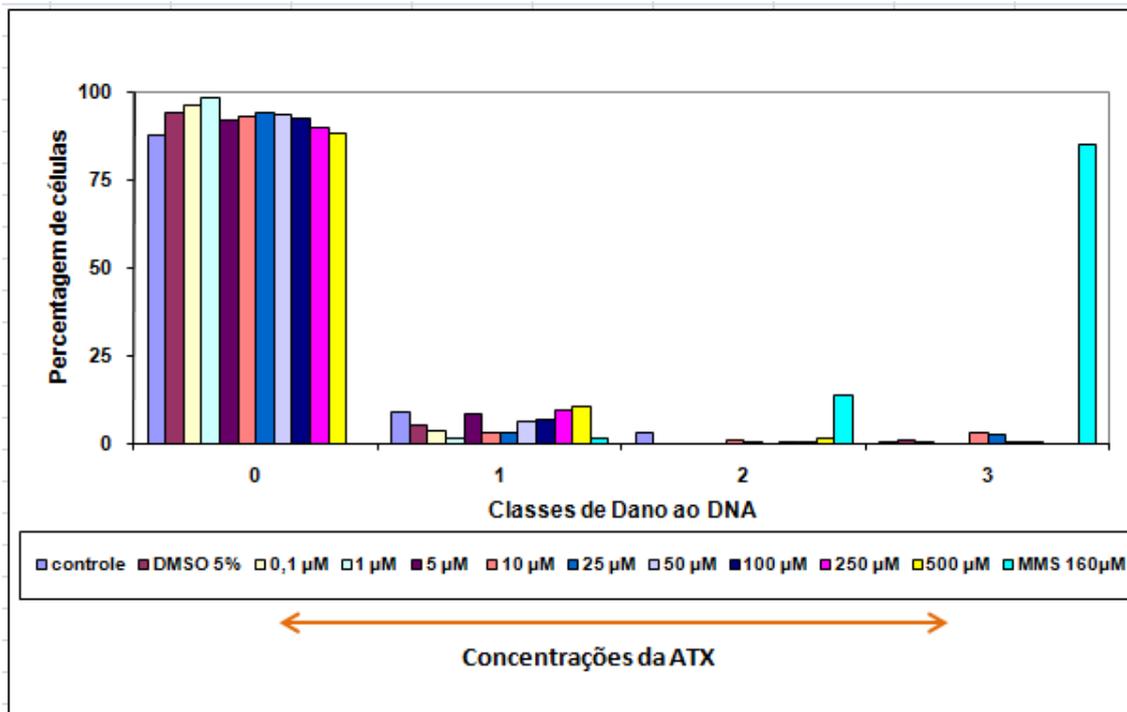


Figura 6: Efeito da astaxantina (ATX) 0,1-500 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao ADN. Primeiro ensaio Cometa (tratamento:2h a 37°C)

**Tabela 6: Efeito de astaxantina em células sanguíneas humanas Segundo ensaio**

EC-ATX 02	Classes de Dano no DNA (%)				U.A.T <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
Controle	94,5	5,0	0,5	0,0	12
Controle-solvente (DMSO 5%)	90,5	8,0	0,5	1,0	24
Astaxantina (µM)					
0,1	93,0	5,5	1,0	0,5	18
1	91,5	7,0	1,0	0,5	21
5	88,5	9,0	1,0	1,5	31
10	92,0	6,5	0,5	1,0	21
25	91,5	7,0	1,0	0,5	21
50	90,5	8,0	0,5	1,0	24
100	90,0	9,0	0,5	0,5	23
250	91,5	7,0	0,0	1,5	23
500	93,0	5,0	1,5	0,5	19
Positivo MMS <sup>2</sup> 160 µM	0,0	1,5	8,5	90,0	577***

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*\*\*Diferença extremamente significativa (p<0,0001) em relação ao controle pelo teste t de Student.

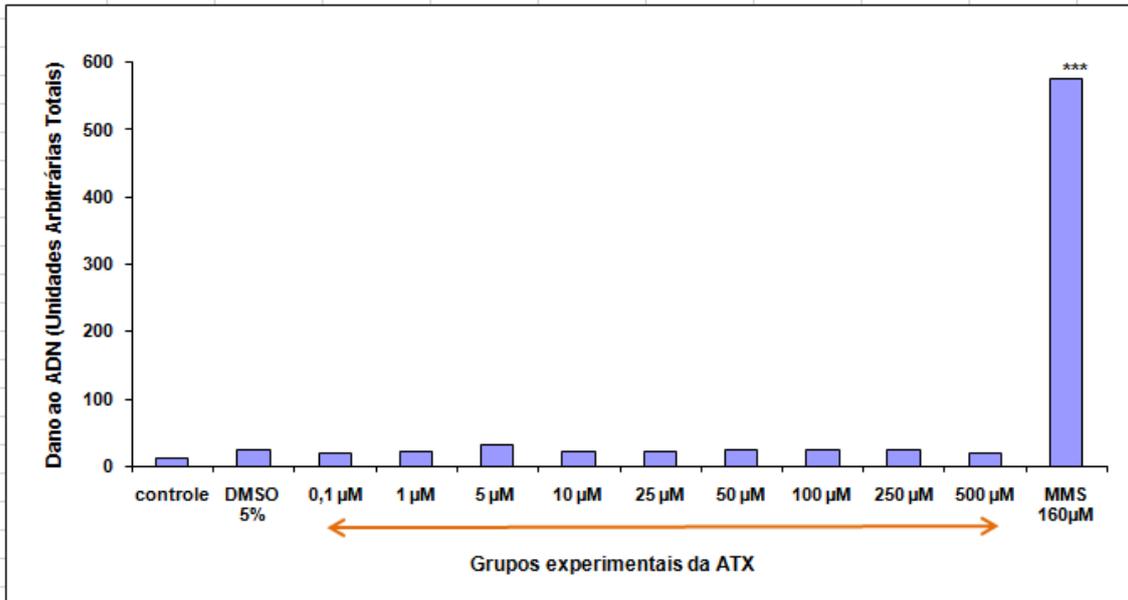


Figura 7 : Efeito da astaxantina (ATX) em células sanguíneas humanas *in vitro* Segundo ensaio Cometa (tratamento: 2h a 37°C)

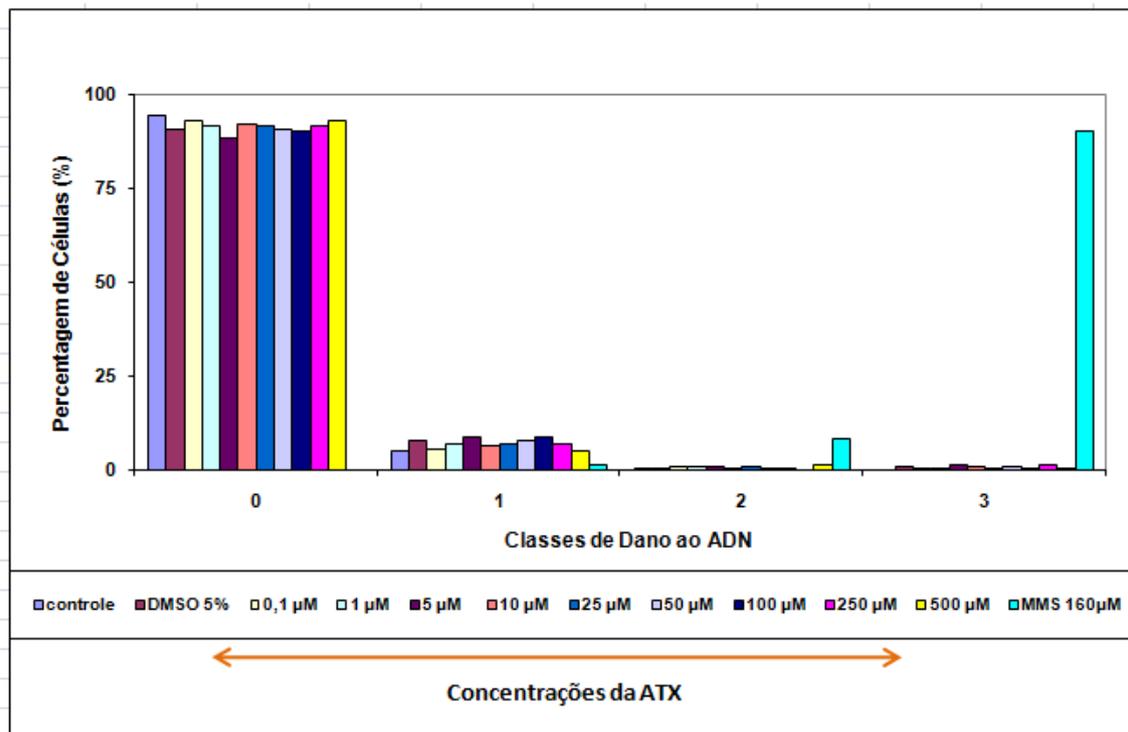


Figura 8: Efeito da astaxantina (ATX) 0,1-500 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao ADN. Segundo ensaio Cometa (tratamento: 2 h a 37°C)

### 6.1.3. Combinação dos ensaios Cometa da ATX

A Tabela 7 (continua) e a Figura 9 mostram o dano ao ADN, expresso como valor médio de Unidades Arbitrárias Totais (UAT) e erro padrão da média (EPM) nos dois ensaios para as nove concentrações de ATX em DMSO 5% e para o MMS 160  $\mu$ M. Ao se combinar os dois ensaios (Ensaio Cometa 1(EC1) e Ensaio cometa 2 (EC2)) independentes realizados, verificamos que o tratamento pelo ATX na faixa de concentrações de 0,1 a 500  $\mu$ M não induziu dano significativo ao ADN ( $p > 0,1$ ) em relação ao DMSO 5%. O controle positivo, MMS 160  $\mu$ M induziu efeito genotóxico extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle.

**Tabela 7 (Continuação) : Efeito de astaxantina em células sanguíneas humanas *in vitro*. Valores médios de U.A.T.  $\pm$  erro padrão da média(Combinação de dois ensaios)**

EC-ATX 01 / EC- ATX 02	Dano ao ADN (Unidades arbitrárias totais )	
	Média	Erro padrão da média (EPM)
Controle	22,50	10,50
Controle-solvente DMSO 5%	20,00	4,00
Astaxantina ( $\mu$ M)		
0,1	14,00	4,00
1	12,00	9,00
5	23,50	7,50
10	24,50	3,50
25	22,00	1,00
50	19,50	4,50
100	20,50	2,50
250	22,00	1,00
500	23,00	4,00
Controle positivo MMS <sup>1</sup> 160 $\mu$ M ***	572,00	5,00

<sup>1</sup>Sulfonato de metil metano. \*\*\*Diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle pelo teste t de Student.

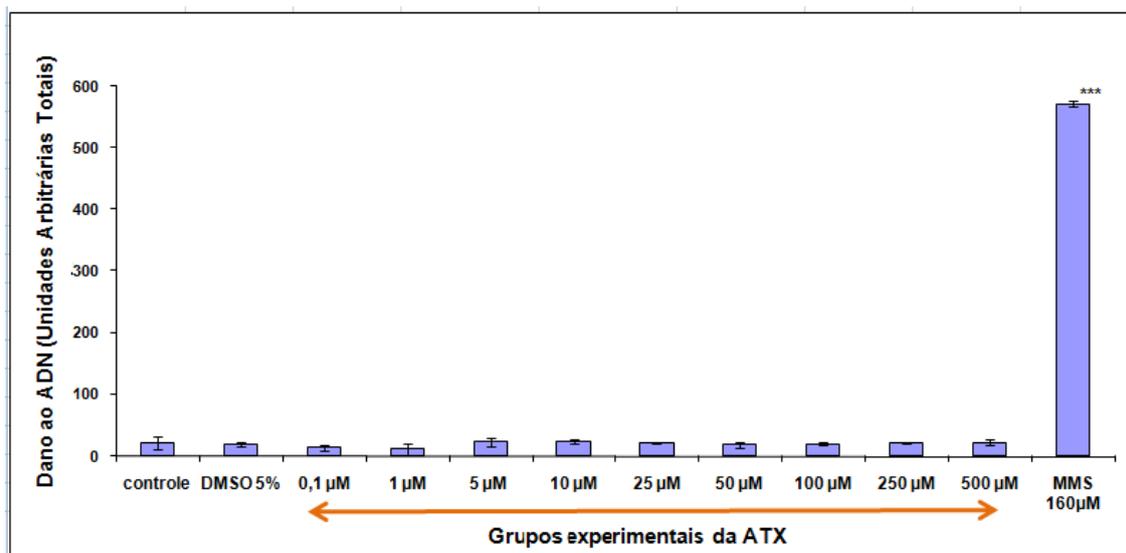


Figura 9: Efeito de astaxantina (ATX) em células sanguíneas humanas *in vitro* Combinação de 2 ensaios Cometa

A combinação dos resultados dos dois ensaios Cometa realizados com ATX indicam que a ATX não foi genotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* nas concentrações de 0,1 a 500 µM após período de tratamento de 2h a 37°C. Adicionalmente, repetibilidade de resultados negativos com a ATX foi observada nos dois ensaios independentes realizados.

Resultados negativos quanto à mutagenicidade em células bacterianas de *Salmonella typhimurium* no teste de Ames foram também detectados para o extrato da alga *H. pluvialis*, fonte natural de ATX como mostrado por Takahashi e colaboradores (2004).

## 6.2 Ensaios de citotoxicidade e Cometa do peróxido de hidrogênio

6.2.1 Ensaio de viabilidade celular mediada pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio do peróxido de hidrogênio.

Após período de tratamento *in vitro* de 10 min em banho de gelo, o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> nas concentrações de 12,5 a 2000 µM, não foi citotóxico, não causando letalidade celular em células sanguíneas humanas (Tabela 8). Todas as concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foram empregadas no ensaio Cometa subsequente.

**Tabela 8: Ensaio de citotoxicidade do Peróxido de Hidrogênio em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: 10 min em gelo**

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular
Controle	0
Controle-solvente (PBS)	0
Peróxido de Hidrogênio ( $\mu\text{M}$ )	
12,5	0
25	0
50	0
100	0
200	0
400	0
1000	0
2000	0

#### 6.2.2 Ensaio Cometa do peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ )

As Tabelas 9 e 10 mostram os resultados individuais dos dois ensaios Cometa realizados com  $\text{H}_2\text{O}_2$  em PBS empregando-se oito concentrações na faixa de 12,5 a 2000  $\mu\text{M}$ . O controle positivo, MMS, mutágeno de ação direta, na concentração de 160 $\mu\text{M}$ , induziu efeito genotóxico altamente significativo ( $p < 0,01$ ) e evidente em relação ao controle-solvente PBS nos dois ensaios realizados. Os resultados de dano ao ADN expressos em UAT são mostrados na Tabela 9 e Figura 10 para o primeiro ensaio e na Tabela 10 e Figura 12 para o segundo ensaio. Adicionalmente, as Figuras 11 e 13 mostram para cada ensaio, a distribuição de dano ao ADN entre as células nas 4 diferentes classes para cada concentração de ATX, bem como, para os controles, PBS e MMS 160  $\mu\text{M}$ .

No primeiro e segundo ensaios, o tratamento das células sanguíneas pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  induziu aumento altamente significativo ( $p < 0,01$ ) na migração de ADN em relação ao controle PBS na faixa de 12,5  $\mu\text{M}$  a 100  $\mu\text{M}$  e nas concentrações de 1000 e 2000  $\mu\text{M}$ . O  $\text{H}_2\text{O}_2$  nas concentrações de 200 e 400  $\mu\text{M}$  causou aumento extremamente significativo ( $p < 0,001$ ) na migração de ADN no primeiro ensaio e significativo ( $p < 0,05$ ), no segundo ensaio Cometa.

**Tabela 9: Efeito do peróxido de hidrogênio em células sanguíneas humanas *in vitro*. Primeiro ensaio Cometa (tratamento:10 min em gelo)**

EC - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 01	Percentual de células nas 4 diferentes classes de dano ao ADN				U.A.T <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
Controle	92,5	7,5	0,0	0,0	15
Controle-solvente (PBS)	97,0	2,5	0,0	0,5	8
Peróxido de hidrogênio (μM)	6.				
12,5	44,0	55,0	1,0	0,0	114**
25	44,5	55,0	0,5	0,0	112**
50	39,0	60,0	1,0	0,0	124**
100	34,5	65,5	0,0	0,0	131**
200	24,0	75,5	0,5	0,0	153***
400	19,5	80,5	0,0	0,0	161***
1000	12,0	87,5	0,5	0,0	177**
2000	13,5	86,0	0,5	0,0	174**
Controle positivo MMS <sup>2</sup> 160μM	0,5	3,0	20,0	76,5	545**

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*\*Diferença altamente significativa (p< 0,01), \*\*\* diferença extremamente significativa (p< 0,001) em relação ao controle PBS pelo teste t de Student.

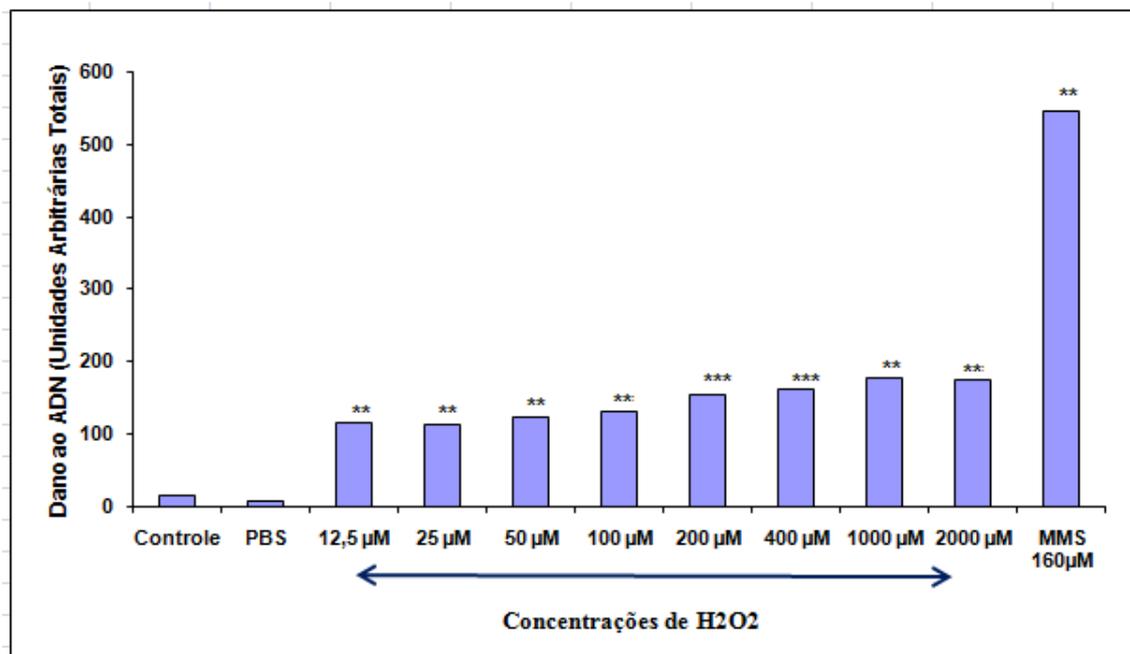


Figura 10: Efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao ADN. Primeiro ensaio (Tratamento de 10 min em banho de gelo).

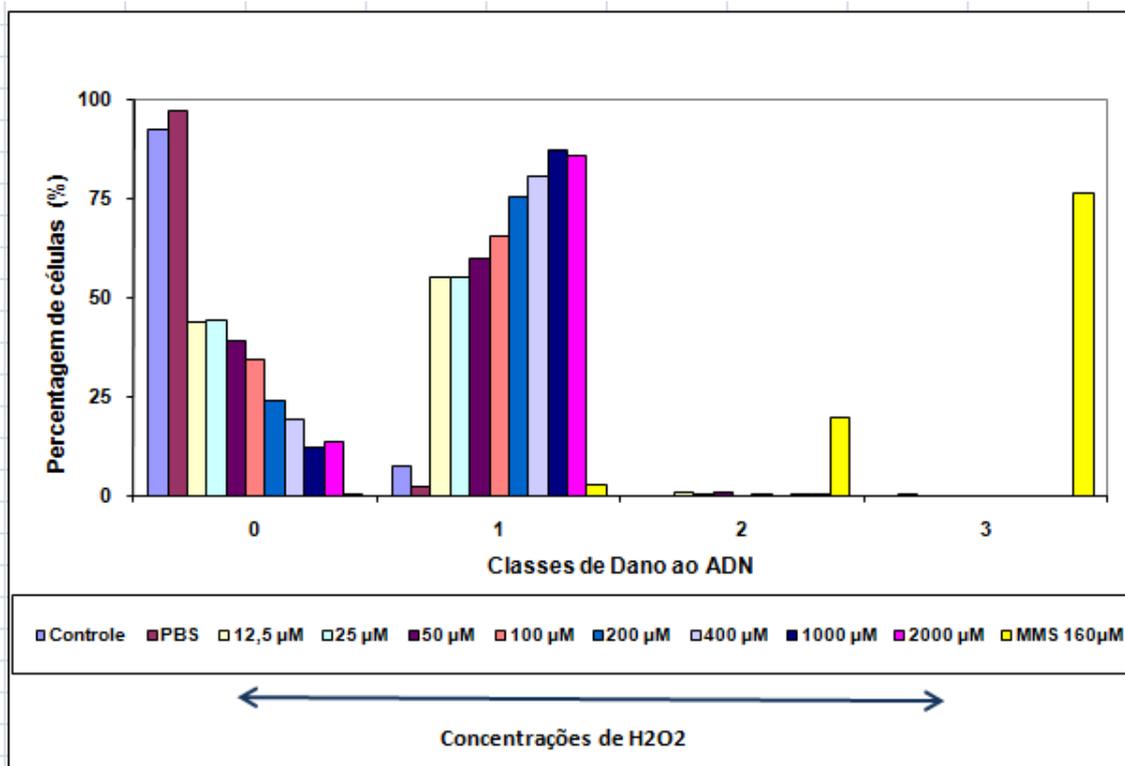


Figura 11: Efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 12,5 - 2000 μM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao ADN. Primeiro ensaio Cometa (tratamento: 10 min. em banho de gelo)

**Tabela 10: Efeito do peróxido de hidrogênio em células sanguíneas humanas *in vitro*. Segundo ensaio Cometa (tratamento: 10 min em gelo)**

EC - H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 02	Percentual de células nas 4 diferentes classes de dano ao ADN				U.A.T. <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
Controle	83,0	17,0	0,0	0,0	34
Controle-solvente (PBS)	89,5	10,0	0,0	0,5	23
Peróxido de hidrogênio (μM)					
12,5	29,5	70,0	0,5	0,0	142**
25	26,0	74,0	0,0	0,0	148**
50	23,0	76,0	0,5	0,5	157**
100	16,5	83,5	0,0	0,0	167**
200	25,0	73,5	0,5	1,0	155*
400	25,0	73,5	0,0	1,5	156*
1000	27,0	67,5	1,0	4,5	166**
2000	29,5	70,0	0,0	0,5	143**
Controle positivo MMS <sup>2</sup> 160μM	0,0	0,0	0,0	100,0	600

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*Diferença significativa (p < 0,05), \*\*diferença altamente significativa (p < 0,01) em relação ao controle PBS pelo teste t de Student.

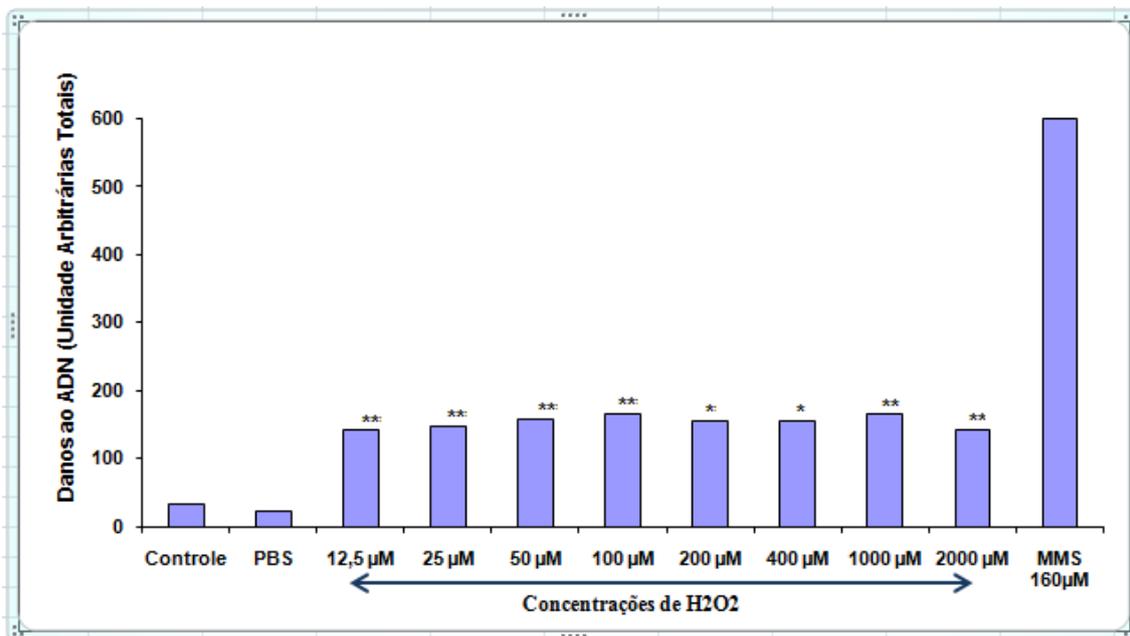


Figura 12: Efeito do  $H_2O_2$  em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao ADN. Segundo ensaio (tratamento de 10 mim em banho de gelo)

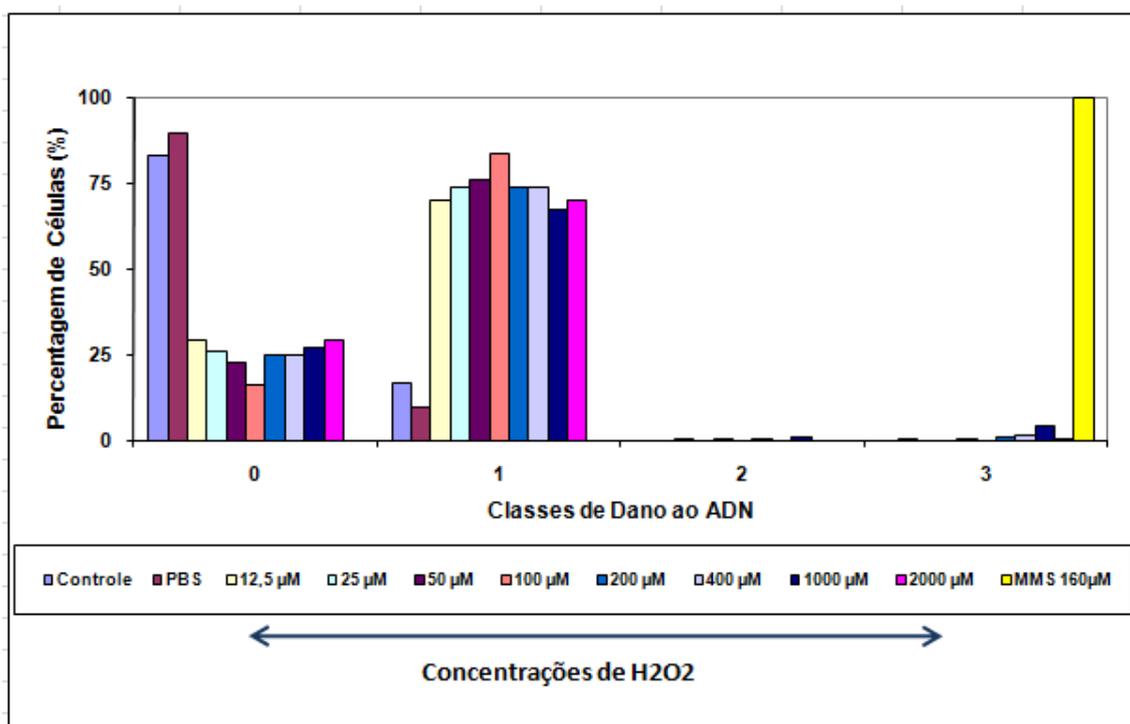


Figura 13: Efeito do peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) 12,5 - 2000 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao ADN. Segundo ensaio Cometa (tratamento: 10 mim em banho de gelo).

### 6.2..3. Combinação dos ensaios Cometa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

A Tabela 11 e a Figura 14 mostram o dano ao ADN, expresso como valor médio de Unidades Arbitrárias Totais (UAT) e erro padrão da média (EPM) nos dois ensaios para as oito concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em PBS e para o MMS 160 µM. Ao se combinar os dois ensaios (EC1 e EC2) independentes realizados, verificamos que o tratamento das células sanguíneas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> durante 10 min em banho de gelo, na faixa de concentrações de 12,5 a 100 µM induziu dano significativo (p< 0,05) e altamente significativo (p< 0,01) ao ADN nas concentrações de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 200 a 2000 µM em relação ao PBS. O controle positivo, MMS 160 µM induziu efeito genotóxico bem evidente e altamente significativo (p< 0,01) em relação ao controle.

**Tabela 11: Efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células sanguíneas humanas *in vitro*. Valores médios de U.A.T. ± erro padrão da média (Combinação de dois ensaios Cometa)**

EC- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 01 / EC- H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 02	Dano ao ADN (Unidades arbitrárias totais)	
	Média	Erro padrão da média
7.		
Controle	24,50	9,50
Controle-solvente (PBS)	15,50	7,50
Peróxido de hidrogênio (µM)	8.	9.
12,5*	128,00	14,00
25*	130,00	18,00
50*	140,50	16,50
100*	149,00	18,00
200**	154,00	1,00
400**	158,50	2,50
1000**	171,50	5,50
2000**	158,50	15,50
Controle positivo MMS <sup>1</sup> 160µM**	572,50	27,50

<sup>1</sup>Sulfonato de metil metano. \*Diferença significativa (p< 0,05), \*\*diferença altamente significativa (p< 0,01) em relação ao controle PBS pelo teste t de Student.

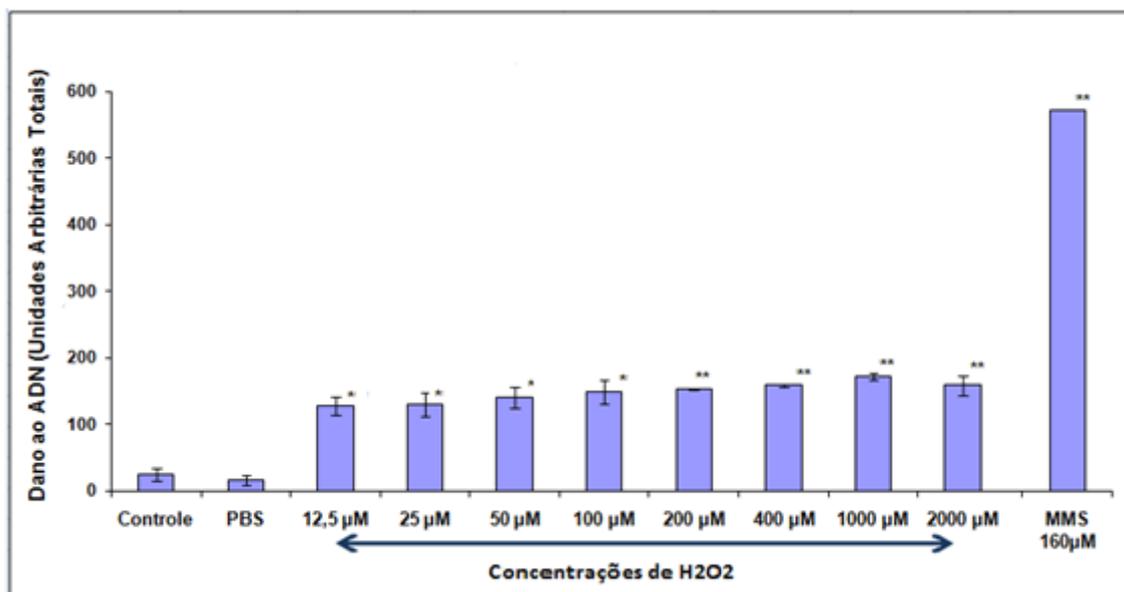


Figura 14: Efeito do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em células sanguíneas humanas *in vitro* Combinação de 2 ensaios Cometa.

A combinação dos resultados dos dois ensaios Cometa realizados com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> indicam que H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi genotóxico em células sanguíneas humanas *in vitro* nas concentrações de 12,5 a 2000 μM após período de tratamento de 10 min em banho de gelo. Adicionalmente, repetibilidade de resultados positivos com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi observada nos dois ensaios independentes realizados.

### 6.3 Efeito da ATX na citotoxicidade e genotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) em células sanguíneas humanas *in vitro* através do ensaio Cometa.

#### 6.3.1 Ensaios de viabilidade celular mediada pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> na presença de ATX

##### 6.3.1.1 Ensaios de viabilidade celular mediada pelo diacetato de fluoresceína e brometo de etídio do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM e 2000 μM na presença de ATX

O pré-tratamento *in vitro* das células sanguíneas humanas durante 2 h pela ATX (25, 100 e 250 μM) e ATX (25, 50 e 500 μM) não causou letalidade celular em células que foram posteriormente tratadas durante 10 min em banho de gelo, respectivamente pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 μM. O reduzido nível de letalidade celular de 1% foi somente encontrado nos pré-tratamentos com as concentrações de 50 e 500 μM de ATX posteriormente tratadas pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM. Semelhante comportamento foi observado nos pré-tratamentos com a ATX 100 μM e 250 μM em células posteriormente tratadas com 2000 μM com letalidade celular, respectivamente de 2% e 1% (Tabela 12). Todos os grupos experimentais foram empregados no ensaio Cometa

**Tabela 12: Ensaio de citotoxicidade do peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 200 e 2000 μM na presença de astaxantina (ATX) em células sanguíneas humanas *in vitro*.**

Grupos	Percentual de decréscimo de viabilidade celular (%)
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 μM	0
DMSO 5% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 μM	0
Combinação ATX e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	
ATX 25 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 μM	0
ATX 50 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 μM	1
ATX 100 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 μM	0
ATX 250 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 μM	0
ATX 500 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 μM	1
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 μM	0
DMSO 5% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 μM	0
Combinação ATX e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	2
ATX 25 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 μM	0
ATX 50 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 μM	0
ATX 100 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 μM	2
ATX 250 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 μM	1
ATX 500 μM + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 μM	0

### 6.3.1.2 Ensaios Cometa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM na presença de ATX

As Tabelas 13 e 14 mostram os resultados individuais dos dois ensaios Cometa realizados com a concentração H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 200 μM na presença da ATX em DMSO 5% empregando-se cinco concentrações de ATX na faixa de 25 a 500 μM. O controle positivo MMS 160 μM mostrou efeito genotóxico bem evidente e altamente significativo (p < 0,01) nos dois ensaios realizados.

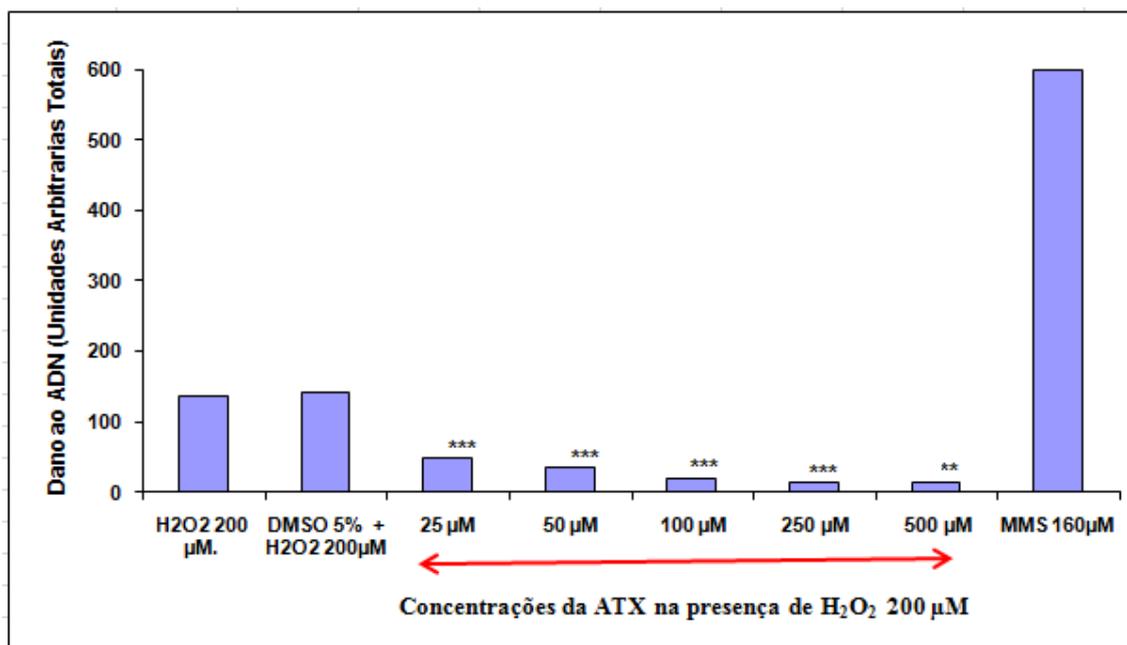
Os resultados de dano ao ADN expressos em UAT são mostrados na Tabela 13 e Figura 15 para o primeiro ensaio e na Tabela 14 e Figura 17 para o segundo ensaio Cometa. Adicionalmente, as Figuras 16 e 18 mostram para cada ensaio, a distribuição de dano ao ADN entre as células nas 4 diferentes classes para cada concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 200 μM na presença da ATX, bem como, para os controles, DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 200 μM e controle (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM)

No primeiro ensaio, o pré-tratamento pela ATX na faixa de concentrações de 25 a 250 μM induziu redução da migração de ADN extremamente significativa (p < 0,001) e altamente significativa (p < 0,01) na concentração de 500 μM quando comparado ao controle DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 200 μM. No segundo ensaio, o pré-tratamento pela ATX em todas as concentrações testadas também causou redução altamente significativa (p < 0,01) na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM quando comparado ao controle DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 200 μM com exceção da concentração de 50 μM de ATX com redução significativa (p < 0,05).

**Tabela 13: Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: ATX (2h a 37°C) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min em gelo). Primeiro ensaio Cometa**

EC- ATX + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM (01)	Percentual de células nas 4 diferentes classes de dano ao ADN (%)				UAT <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	31,0	69,0	0,0	0,0	138
DMSO 5% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	28,5	71,5	0,0	0,0	143
Combinação ATX e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					
ATX 25µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	92,5	7,5	0,0	0,0	15***
ATX 50µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	93,0	7,0	0,0	0,0	14***
ATX100µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	89,5	10,5	0,0	0,0	21***
ATX250µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	81,5	18,5	0,0	0,0	37***
ATX500µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	76,5	23,0	0,0	0,5	49**
Controle positivo MMS 160µM	0,0	0,0	0,0	100,0	600

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*\*Diferença altamente significativa (p< 0,01), \*\*\*diferença extremamente significativa (p< 0,001) em relação ao controle DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>200µM pelo teste t de Student.



**Figura15:** Efeito da astaxantina na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Primeiro ensaio Cometa.

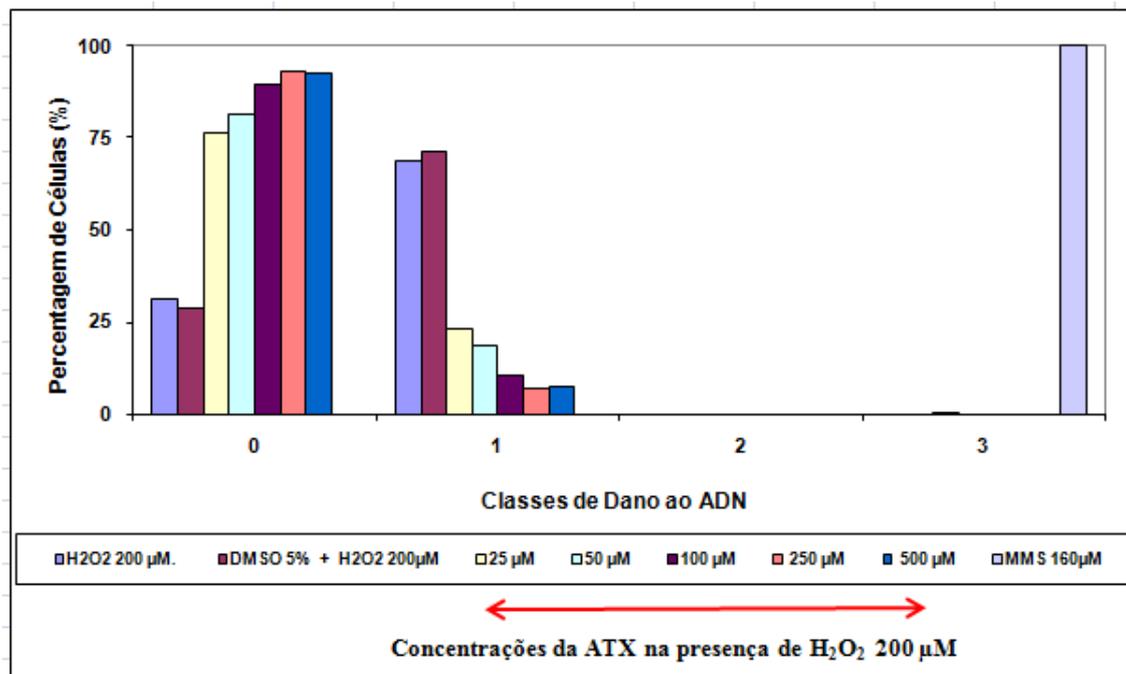
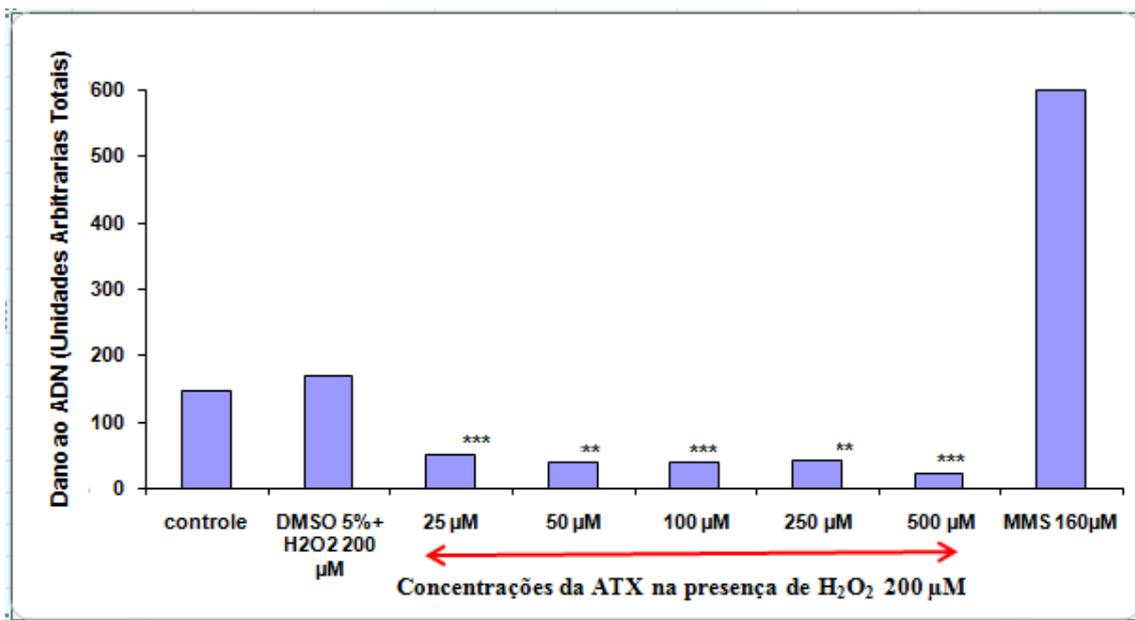


Figura 16: Efeito da astaxantina na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA Primeiro ensaio Cometa

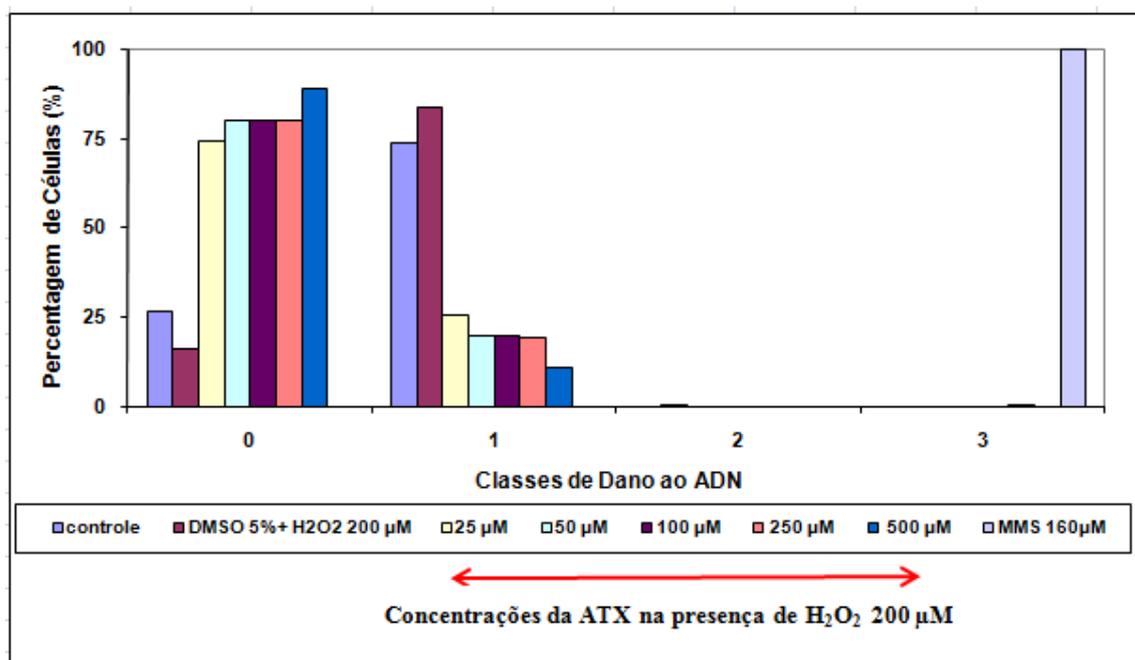
**Tabela 14: Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: ATX (2h a 37°C) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min em gelo). Segundo ensaio Cometa**

EC- ATX + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM (02)	Percentual de células nas 4 diferentes classes de dano ao ADN (%)				UAT <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	26,5	73,5	0,0	0,0	147
DMSO 5% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	16,0	83,5	0,5	0,0	169
Combinação ATX e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					
ATX 25µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	74,5	25,5	0,0	0,0	51***
ATX 50µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	80,0	20,0	0,0	0,0	40**
ATX100µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	80,0	20,0	0,0	0,0	40***
ATX250µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	80,0	19,5	0,0	0,5	42**
ATX500µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	89,0	11,0	0,0	0,0	22***
Controle positivo MMS 160µM	0,0	0,0	0,0	100,0	600

<sup>1</sup>Unidades arbitrárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*\*Diferença altamente significativa (p< 0,01), \*\*\*diferença extremamente significativa (p< 0,001) em relação ao controle DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>200µM pelo teste t de Student.



**Figura 17:** Efeito da astaxantina na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Segundo ensaio Cometa.



**Figura 18:** Efeito da astaxantina na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 μM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA Segundo ensaio Cometa..

### 6.3.1.3. Combinação dos ensaios Cometa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM na presença de ATX

A Tabela 15 e a Figura 19 mostram o dano ao ADN, expresso como valor médio de Unidades Arbitrárias Totais (UAT.) e erro padrão da média nos dois ensaios de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM na ausência de ATX (DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM) e na presença de 5 concentrações de ATX (25 a 500 µM) em DMSO 5% e para o MMS 160 µM. Ao se combinar os dois ensaios (EC1 e EC2) independentes realizados verificamos que o pré-tratamento *in vitro* das células sanguíneas durante 2 h pela ATX em todas as concentrações na faixa de 25 a 500 µM de ATX induziu redução da migração de ADN altamente significativa (p<0,01) em relação ao controle DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 200 µM com exceção de 50 µM de ATX que reduziu significativamente (p< 0,05) a genotoxicidade causada pelo tratamento durante 10 min pelo H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM. O MMS 160 µM, controle positivo mostrou na combinação dos dois ensaios realizado efeito genotóxico extremamente significativo (p< 0,001).

**Tabela 15 : Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: ATX (2h a 37°C) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min em gelo). (Combinação de dois ensaios)**

EC- ATX + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM (01)/ EC- ATX + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM (02)	Dano ao ADN (Unidades arbitárias totais)	
	Média	Erro padrão da média
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM	142,50	4,50
DMSO 5% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM	156,00	13,00
<b>Combinação ATX e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub></b>		
ATX 25µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM**	18,50	3,50
ATX 50µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM*	28,00	14,00
ATX100µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM**	30,50	9,50
ATX250µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM**	38,50	1,50
ATX500µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200 µM**	50,00	1,00
Controle positivo MMS <sup>1</sup> 160µM***	581,50	18,50

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*Diferença significativa (p< 0,05) \*\*Diferença altamente significativa (p< 0,01), \*\*\*diferença extremamente significativa (p< 0,001) em relação ao controle DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>200µM pelo teste t de Student.

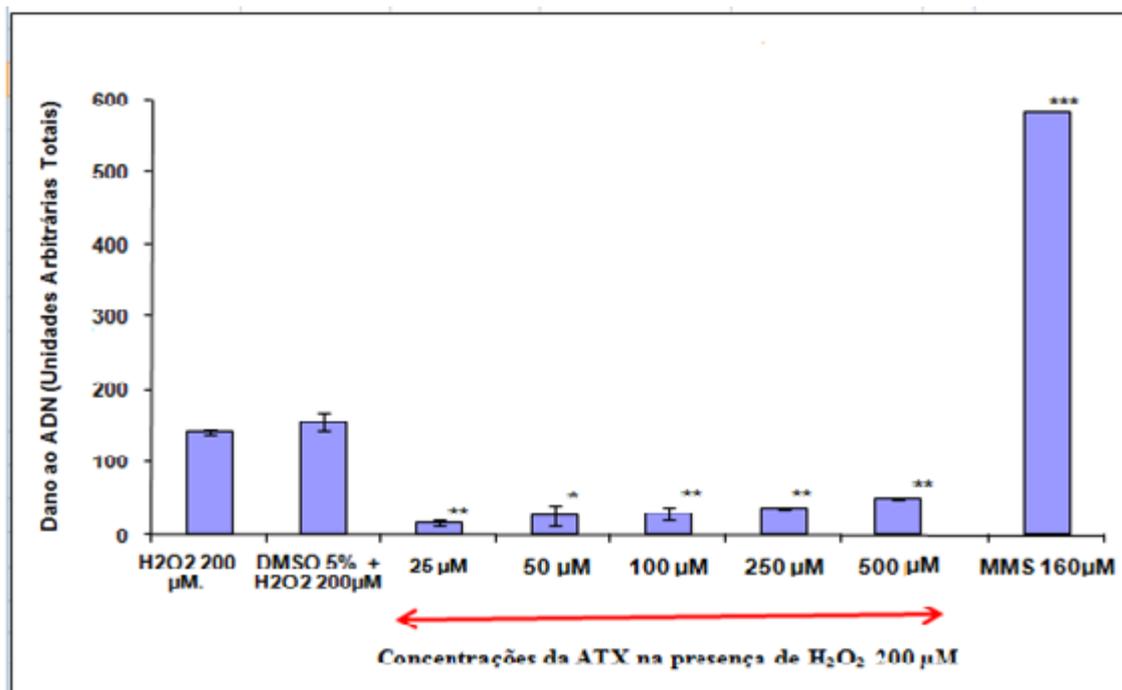


Figura 19: Efeito da astaxantina na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Combinação de dois ensaios Cometa.

Demonstramos, desta forma, o efeito protetor da ATX na faixa de concentrações de 25 a 500 µM na indução de dano oxidativo ao ADN causado pelo peróxido de hidrogênio 200 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Adicionalmente, repetibilidade destes resultados foi observada nos dois ensaios independentes realizados.

### 6.3.2.1 Ensaios Cometa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 µM na presença de ATX

As Tabelas 16 e 17 mostram os resultados individuais dos dois ensaios Cometa realizados com o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 µM na presença da ATX em DMSO 5% empregando-se cinco concentrações de ATX na faixa de 25 a 500 µM. O controle positivo MMS 160 µM mostrou efeito genotóxico bem evidente nos dois ensaios realizados.

Os resultados de dano ao ADN expressos em UAT são mostrados na Tabela 16 e Figura 20 para o primeiro ensaio e na Tabela 17 e Figura 22 para o segundo ensaio Cometa. Adicionalmente, as Figuras 21 e 23 mostram para cada ensaio, a distribuição de dano ao ADN entre as células nas 4 diferentes classes para cada concentração de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2000 µM na presença da ATX, bem como, para os controles, DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2000 µM e controle (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 µM)

No primeiro ensaio Cometa, o pré-tratamento pela ATX na faixa de concentrações de 25 a 250 µM induziu redução da migração de ADN altamente significativa ( $p < 0,01$ ) e extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) na concentração de 500 µM quando comparado ao controle DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de 2000 µM. No segundo ensaio, o pré-tratamento pela ATX em todas as concentrações testadas também causou redução altamente significativa ( $p < 0,01$ ) quando comparado à genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 µM com exceção da concentração de 25 µM de ATX que induziu redução altamente significativa ( $p < 0,001$ ).

**Tabela 16: Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: ATX (2h a 37°C) + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (10 min em gelo). Primeiro ensaio Cometa**

EC- ATX + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM (01)	Percentual de células nas 4 diferentes classes de dano ao ADN (%)				UAT <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM	21,5	76,5	1,0	1,0	163
DMSO 5% + H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM	22,5	73,0	1,0	3,5	171
Combinação ATX e H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>					
ATX 25µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM	80,5	19,0	0,0	0,5	41**
ATX 50µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM	75,5	24,5	0,0	0,0	49**
ATX100µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM	79,5	18,5	0,5	1,5	48**
ATX250µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM	86,0	13,5	0,5	0,0	29**
ATX500µM+ H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 2000 µM	76,0	22,5	0,5	1,0	53***
Controle positivo MMS 160µM	0,0	0,0	0,0	100,0	600

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*\*Diferença altamente significativa (p< 0,01), \*\*\*diferença extremamente significativa (p< 0,001) em relação ao controle DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>200µM pelo teste t de Student.

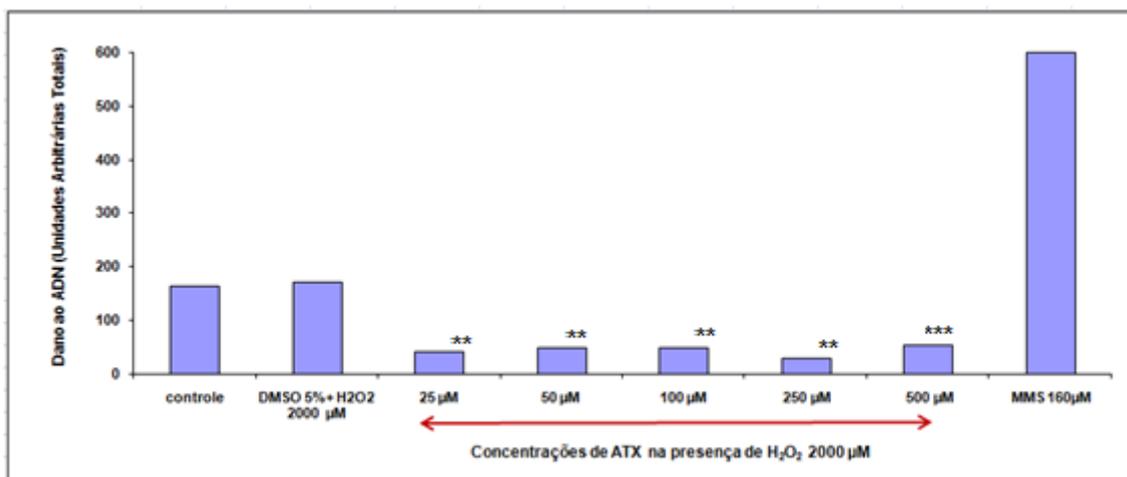


Figura 20: Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 µM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Primeiro ensaio Cometa.

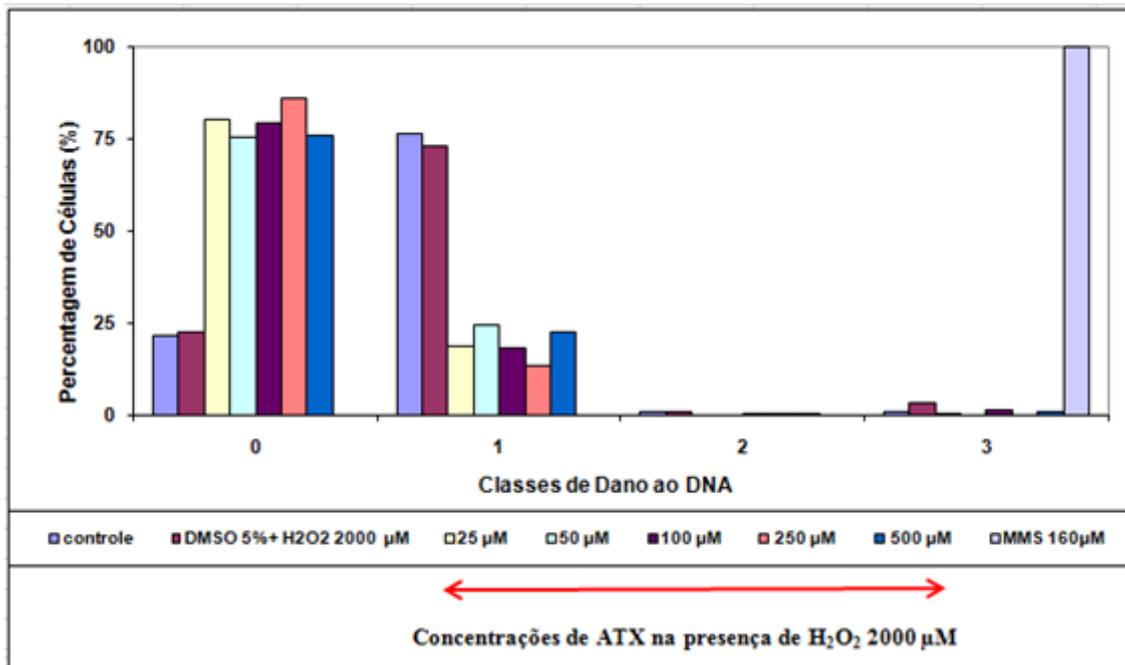


Figura 21: Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do  $H_2O_2$  2000  $\mu M$  em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA. Primeiro ensaio Cometa.

**Tabela 17: Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do  $H_2O_2$  2000  $\mu M$  em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: ATX (2h a 37°C) +  $H_2O_2$  (10 min em gelo). Segundo ensaio Cometa.**

EC- ATX + $H_2O_2$ 2000 $\mu M$ (02)	Percentual de células nas 4 diferentes classes de dano ao ADN (%)				UAT <sup>1</sup>
	0	1	2	3	
$H_2O_2$ 2000 $\mu M$	37,0	62,0	0,5	0,5	129
DMSO 5% + $H_2O_2$ 2000 $\mu M$	52,0	46,0	0,0	2,0	104
Combinação ATX e $H_2O_2$					
ATX 25 $\mu M$ + $H_2O_2$ 2000 $\mu M$	82,5	17,5	0,0	0,0	35***
ATX 50 $\mu M$ + $H_2O_2$ 2000 $\mu M$	84,0	14,5	0,0	1,5	38**
ATX100 $\mu M$ + $H_2O_2$ 2000 $\mu M$	85,0	14,0	0,5	0,5	33**
ATX250 $\mu M$ + $H_2O_2$ 2000 $\mu M$	93,5	6,5	0,0	0,0	13**
ATX500 $\mu M$ + $H_2O_2$ 2000 $\mu M$	90,5	9,0	0,0	0,5	21**
Controle positivo MMS 160 $\mu M$	0,0	0,0	0,0	100,0	600

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*\*Diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ), \*\*\*diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle DMSO 5% +  $H_2O_2$ 2000 $\mu M$  pelo teste t de Student.

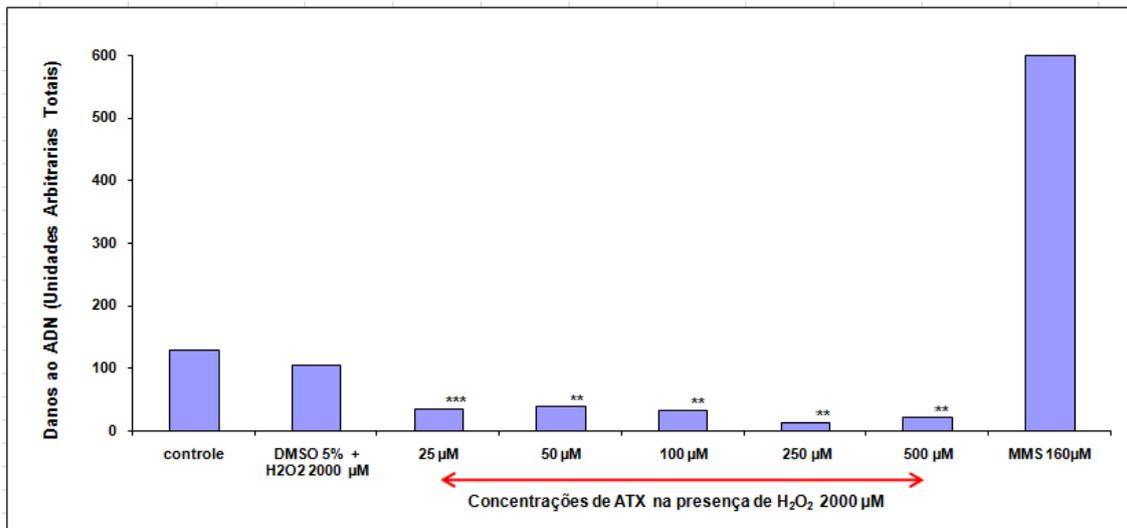


Figura 22: Efeito da astaxantina na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 μM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Segundo ensaio Cometa.

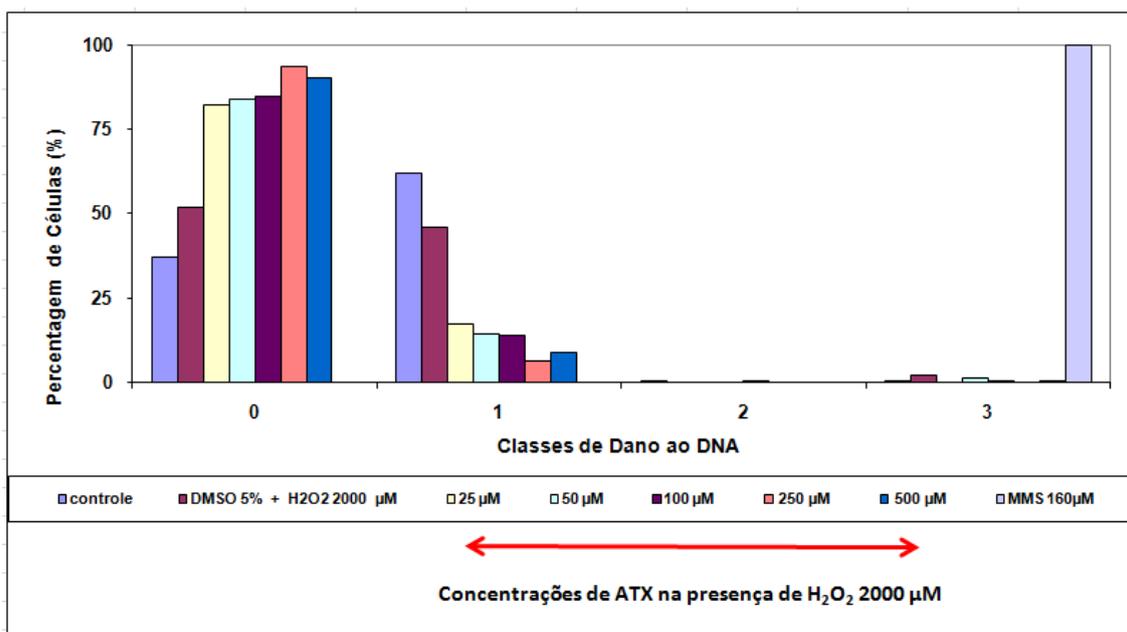


Figura 23: Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 μM em células sanguíneas humanas *in vitro*. Distribuição intercelular de dano ao DNA. Segundo ensaio Cometa.

### 6.3.2.2 Combinação dos ensaios Cometa do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 μM na presença de ATX

A Tabela 18 e a Figura 24 mostram o dano ao ADN, expresso como valor médio de Unidades Arbitrárias Totais (UAT.) e erro padrão da média (EPM) nos dois ensaios de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 μM na ausência de ATX (DMSO 5% + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 2000 μM) e na presença de 5 concentrações de ATX (25 a 500 μM) em DMSO 5% e para o MMS 160 μM. Ao se

combinar os dois ensaios Cometa (EC1 e EC2) independentes realizados verificamos que o pré-tratamento *in vitro* das células sanguíneas durante 2 h pela ATX em todas as concentrações, na faixa de 25 a 500  $\mu\text{M}$  de ATX induziu redução significativa ( $p < 0,05$ ) da genotoxicidade causada pelo tratamento durante 10 min pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  2000  $\mu\text{M}$ . O MMS 160  $\mu\text{M}$ , controle positivo mostrou na combinação dos dois ensaios realizado efeito genotóxico bem evidente. Adicionalmente, repetibilidade destes resultados foi observada nos dois ensaios independentes realizados.

**Tabela18 : Efeito da astaxantina (ATX) na genotoxicidade do  $\text{H}_2\text{O}_2$  2000  $\mu\text{M}$  em células sanguíneas humanas *in vitro*. Tratamento: ATX (2h a 37°C) +  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10 min em gelo). (Combinação de dois ensaios Cometa)**

EC- ATX + $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$ (01)/ EC- ATX + $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$ (02)	Dano ao ADN (Unidades arbitárias totais)	
	Média	Erro padrão da média
$\text{H}_2\text{O}_2$ 200 $\mu\text{M}$	146,00	17,00
DMSO 5% + $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$	137,50	33,50
<b>Combinação ATX e <math>\text{H}_2\text{O}_2</math></b>		
ATX 25 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$	38,00	3,00*
ATX 50 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$	43,50	5,50*
ATX100 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$	40,50	7,50*
ATX250 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$	37,00	16,00*
ATX500 $\mu\text{M}$ + $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$	21,00	8,00*
Controle positivo MMS <sup>1</sup> 160 $\mu\text{M}$	600	0

<sup>1</sup>Unidades arbitárias totais. <sup>2</sup>Sulfonato de metil metano. \*Diferença significativa ( $p < 0,05$ ) \*\*Diferença altamente significativa ( $p < 0,01$ ), \*\*\*diferença extremamente significativa ( $p < 0,001$ ) em relação ao controle DMSO 5% +  $\text{H}_2\text{O}_2$ 2000 $\mu\text{M}$  pelo teste t de Student.

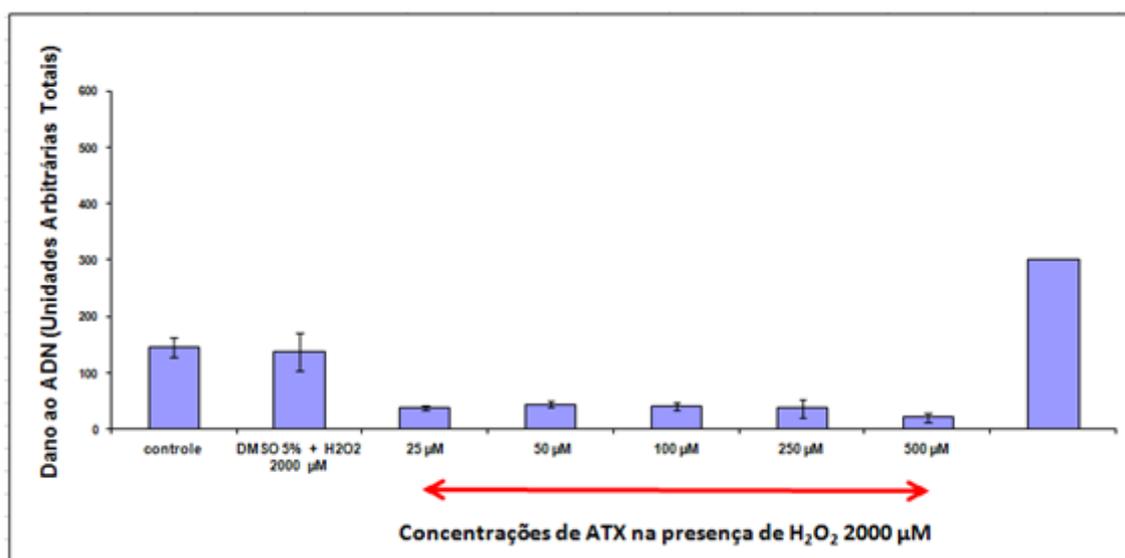


Figura 24: Efeito da astaxantina na genotoxicidade do  $\text{H}_2\text{O}_2$  2000  $\mu\text{M}$  em células sanguíneas humanas *in vitro*. Combinação de dois ensaios Cometa.

Demonstramos o efeito protetor da ATX na faixa de concentrações de 25 a 500  $\mu\text{M}$  na indução de dano oxidativo ao ADN causado pelo peróxido de hidrogênio 200  $\mu\text{M}$  e em concentração dez vezes superior de 2000  $\mu\text{M}$  em células sanguíneas humanas *in vitro*.

Os efeitos relacionados à propriedade antioxidante da ATX também têm sido demonstrados e descritos por Hussein e colaboradores (2005) contra radicais induzidos pelo processo isquêmico. Li e colaboradores (2004) apontaram que a ATX apresenta atividade antiapoptótica. Hussein e colaboradores (2006), em outro estudo demonstraram que a ATX reduziu os níveis plasmáticos de  $\text{NO}_2^-/\text{NO}_3^-$  em ratos hipertensos, o que evitaria a formação de espécies reativas de nitrogênio. Em outros estudos de Hussein (2005, 2006) descreveram o efeito antihipertensivo da ATX, ligado a sua atividade, principalmente contra o radical superóxido, prevenindo a degradação do óxido nítrico mediada por essa espécie, resultando em relaxamento vascular. A ATX apresentou melhor potencial protetor que a glutatona contra a degradação protéica induzida por cálcio em cristalino de suíno e o possível mecanismo para esse efeito antiproteolítico parece ser a capacidade da ATX de formar complexos com o cálcio, diminuindo a disponibilidade desse mineral para as reações de proteólise (WU et al., 2006).

A atividade antioxidante de três substâncias, luteína, zeatina e ATX foi medida pelo ensaio Cometa utilizando como sistema biológico, as células de neuroblastoma humano, SK-N-SH, *in vitro*, através da indução de danos ao ADN por fotoreceptores estimulados pela radiação ultravioleta. Esses dados forneceram informações sobre a cinética de reparação do dano ao ADN causado por estas substâncias em células SK.N.SH em pequenos espaços de tempo agindo de forma a diminuir o efeito do dano, e demonstrando que a exposição a essas substâncias por tempo mais prolongado não está relacionado a um efeito constante de proteção, porém não apresentaram efeito genotóxico (SANTOCONO et al., 2006).

Nosso estudo também mostrou que a ATX não foi genotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* nas concentrações de 0,1 a 500  $\mu\text{M}$  após período de tratamento de 2 h a 37°C. Nas mesmas condições de tratamento, a ATX (0,1 a 5  $\mu\text{M}$ ), não foi citotóxica não causando letalidade de células sanguíneas humanas *in vitro* sendo, porém, levemente citotóxica na faixa de 10 a 1000  $\mu\text{M}$  induzindo de 1 a 10% de letalidade celular quando comparado ao controle.

Tripathi e colaboradores (2008) conduziram um estudo que demonstraram os efeitos citotóxicos e genotóxicos da ciclofosfamida (CP) em células germinativas de camundongos e o efeito protetor significativo da ATX sobre os parâmetros analisados no estudo, tais como o peso dos testículos, a contagem de espermatozoides e a morfologia dos espermatozoides.

Por estar a CP relacionada ao estresse oxidativo em ratos, estudos com a ATX foram realizados empregando-se os ensaios Cometa, de micronúcleo e de aberrações cromossômicas a partir de sangue periférico e de medula óssea de ratos. O pré-tratamento com a ATX (colocar a dose) causou redução de danos ao ADN e de estresse oxidativo induzidos pela CP em ratos, indicando-se a ATX no estudo como um agente quimiopreventivo contra a toxicidade da droga antineoplásica CP (TRIPATHI et al, 2009).

Os efeitos do pré e pós-tratamentos com a ATX foram avaliados, posteriormente, em estudo, onde foi avaliada sua atividade na redução do estresse oxidativo induzido pela ciclofosfamida (CP) ao ADN de células hepatocarcinogênicas iniciadas, avaliando-se as respostas de células indicadoras. De modo geral a ATX diminuiu os efeitos do estresse oxidativo e dos danos ao ADN de células do fígado ocorrendo uma diminuição significativa no pós-tratamento. Esse estudo pode confirmar que a ATX é um potente antioxidante e atenua

o estresse oxidativo, danos ao ADN, à morte celular, bem como a indução inicial de hepatocarcinogênese pela CP em ratos (THIPATHI et al, 2010).

Por sua vez, Kajima et. al, 2008, concluíram que por via ocular, a ATX quando administrada na dose de 100 mg/kg, quatro vezes em um intervalo de 24 horas, ou seja de 6 em 6 horas, a ATX inibiu a neurotoxicidade induzida por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ou privação de soro, e reduziu a oxidação intracelular induzida por várias espécies reativas de oxigênio, induzidas por injeções intravítreas do aminoácido excitatório agonista do neurotransmissor glutamato N-metil-D-aspartato (NMDA).

Estudo anterior tem mostrado que a ATX protege as mitocôndrias de ratos deficientes em vitamina E de danos causados por peroxidação lipídica catalisada pelo Fe<sup>+2</sup>, tanto *in vivo* quanto *in vitro*. O efeito inibitório de ATX sobre a peroxidação lipídica mitocondrial é mais potente do que a de  $\alpha$ -tocoferol (KURASHIGE et al, 1990).

Desta forma a ATX tem sido apontada como sendo mais efetiva que a luteína e  $\beta$ -caroteno em restaurar as atividades de SOD e CAT alteradas por radiação UVA e peroxidação lipídica em fibroblastos de ratos (O'Connor; O'Brien, 1998). Em outro estudo foi demonstrado que a ATX restaurou as atividades da SOD, CAT e GSH-Px alteradas pela exposição de fibroblastos de frangos ao paraquat (LAWLOR; O'BRIEN, 1995), além de prevenir peroxidação lipídica em microsomas hepáticos de ratos (PALOZZA; KRINSKY, 1992).

A ATX foi o único carotenóide capaz de inibir a propagação da peroxidação lipídica causada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em lipossomas contendo Fe<sup>+2</sup>, provavelmente devido a duas propriedades combinadas: o efeito impermeabilizante da membrana, responsável por limitar a entrada de agentes que promovam a lipoperoxidação no interior da membrana além da ação antioxidante do carotenóide, conforme Barros e colaboradores (2001). De acordo com Goto e colaboradores (2001), a ATX protegeu tanto o interior quanto a superfície de membranas fosfolipídicas contra a peroxidação de lipídios *in vitro*.

Adicionalmente, a ATX reduziu as expressões da proteína indicadora da peroxidação lipídica, 4-hidroxi-2-nonenal (4-HNE)-modificada e de 8-hidroxi-desoxiguanosina (8-OHdG: indicador de danos oxidativos ao ADN). Logo, a ATX mostrou efeitos neuroprotetores contra os danos na retina *in vivo* e *in vitro*, e que seus efeitos protetores podem ter sido parcialmente mediados via seu efeito antioxidante. (KAJIMA et. al, 2008).

Em um estudo envolvendo mulheres jovens a ATX foi oferecida por 8 semanas em experimento randomizado, duplo cego e placebo controlado, com o objetivo de estudar os efeitos da ação da ATX na dieta e na modulação da resposta imune desse grupo. A ATX mostrou uma diminuição do efeito de um biomarcador importante em danos relativos ao ADN, assim como de proteínas de fase aguda, resultando em uma melhor resposta imunológica atribuída ao seu consumo (PARK et al., 2010).

Chew e colaboradores (2011), investigaram a resposta imune em cães fêmeas da raça Beagle, que foram alimentados com diferentes doses de ATX em períodos de tempo determinados. Foram colhidas amostras de sangue, onde foram avaliadas a proliferação de linfócitos, de leucócitos, a citotoxicidade de células killer (CK), assim como IgG, IgM, proteínas no sangue e determinadas as concentrações de ATX nas amostras. A concentração sanguínea da ATX se mostrou dose dependente, assim como ocorreu um aumento nos níveis de IgG o que não ocorreu com o IgM que ficou estável. Por outro lado, houve aumento das CK, no decorrer do estudo e ocorreu leve diminuição do nível de proteínas C reativas. Concluiu-se que, a ATX na dieta aumenta a resposta imune reduzindo os danos ao ADN e a resposta inflamatória em cães

## 7. CONCLUSÕES

- A ATX (0,1 a 5  $\mu\text{M}$ ), após período de tratamento de 2h a 37 °C, não foi citotóxica em células sanguíneas humanas *in vitro* sendo citotóxica na faixa de 10 a 1000  $\mu\text{M}$  induzindo de 1 a 10% de letalidade celular quando comparado ao controle-solvente (DMSO 5%).
- A ATX não induziu dano ao ADN ( $p>0,1$ ) em células sanguíneas humanas na faixa testada de 0,1 a 500  $\mu\text{M}$  quando comparado ao controle.
- O  $\text{H}_2\text{O}_2$  (12,5 a 2000  $\mu\text{M}$ ), após período de tratamento de 10 min não foi citotóxico não causando letalidade celular em células sanguíneas humanas *in vitro*.
- O  $\text{H}_2\text{O}_2$  após período de tratamento de 10 min foi genotóxico ( $p<0,05$ ) em células sanguíneas humanas *in vitro* causando dano ao ADN na faixa de concentrações de 12,5 a 2000  $\mu\text{M}$ .
- O pré-tratamento *in vitro* das células sanguíneas humanas durante 2h pela ATX (25, 50, 100, 250 e 500  $\mu\text{M}$ ) causou redução altamente significativa ( $p< 0,01$ ) do efeito genotóxico causado por 200 e 2000  $\mu\text{M}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  durante 10 min.
- Demonstramos o efeito protetor da ATX na faixa de concentrações de 25 a 500  $\mu\text{M}$  na indução de dano oxidativo ao ADN causado pelo  $\text{H}_2\text{O}_2$  200 e 2000  $\mu\text{M}$  em células sanguíneas humanas *in vitro*.

## 8. BIBLIOGRAFIA

ANDERSON, D., YU, T. W., MCGREGOR, D. B. Comet assay responses as indicators of carcinogen exposure. **Mutagenesis**, v.13, p. 539-555, 1999.

AGOSIN, M. Comercio y crecimiento en Chile. **Revista de la CEPAL**, Santiago de Chile, v. 68, p. 79-100,1999.

AKIBA et al, Broiler Chickens by feeding yeast *Phaffia Rhodozyma* containing high concentrations of astaxanthin,J. **Appl. Poult. Res.** V.10, p. 154–161,2001

BARROS, M.P. et al. Astaxanthin and Peridin inhibit oxidative damage in  $\text{Fe}^{+2}$ -loaded liposomes: scavenging oxyradicals or changing membrane permeability, **Biochem Biophys Res Comm.** v. 228, p. 225-232, 2001.

BAUERNFEIND, J.C. Carotenoid vitamin A precursors and analogs in food and feeds. **Journal of Agricultural Food Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 456-473, 1972.

BRASIL, **Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**, Secretaria de Defesa Agropecuária, Departamento de Inspeção de Produtos de Origem Animal, Resolução Nº 1, de 7 De Março de 2008, D.O.U.

BRASIL, **Ministério da Pesca e Aquicultura**, Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2008-2009

BRASIL, **Ministério da Pesca e Aquicultura**, Boletim estatístico da pesca e aquicultura, 2010.

BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**, Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes, Brasília/DF, Fevereiro de 2013

BRASIL, **Agência Nacional de Vigilância Sanitária**. Resolução n. 16, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos para registro de Alimentos e ou Novos ingredientes, constante do anexo desta Portaria. Diário Oficial da União, Poder Executivo, de 3 de dezembro, 1999

BRIANEZI, G. S. et al Desenvolvimento e validacao de tecnica quantitativa de analise de imagem para avaliacao do teste do cometa corado pela prata, **J Bras Patol Med Lab**, v. 45 , n. 4, p. 325-334, 2009

BONFIM, T. M. B. *Produção de astaxantina pela levedura Phaffia rhodozyma (Xanthophyllomyces dendrorhous) a partir de meios de cultura de baixo custo*. Curitiba, 1999.158 p. [Tese de Doutorado em Ciências, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná].

CEPAL. *América Latina y el Caribe: políticas para mejorar la inserción en la economía mundial*. Santiago de Chile: Fondo de Cultura Económica, 1998.

CHEW, B.P. et al. A comparison of the anticancer actitives of dietary beta carotene, canthaxanthin and astaxanthin in mice vivo. **Anticancer Res**. V.19, p 1849-183, 1999.

CHEW, B.P. et al. Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs, **Veterinary Immunology and Immunopathology**, Volume 140, p. 199–206, 2011

CHEWA, B.P, MATHISONA, B.D, HAYEKB, M. G., MASSIMINOB, S., REINHARTB, G.A., PARKA, J.S, Dietary astaxanthin enhances immune response in dogs, **Veterinary Immunology and Immunopathology** 140, p. 199–206, 2011

CONFORTI-FROES, N., VARELLA-GRACIA, M., SILVA, A.A., Utilização do corante da beterraba como aditivo amilentar, **Alim. Nutr.**, São Paulo, v. 4, p.33-44, 1992.

DERNER, R.B., OHSE S., VILLELA, M., CARVALHO, S.M., FETT, R., Microalgas, produtos e aplicações **Ciência Rural**, Santa Maria, v.36, n.6, p.1959-1967, 2006

DUSINSKA, M. e COLLINS, A.R. The comet assay in human biomonitoring: gene-environment interactions. **Mutagenesis**, v.23, p. 191-205, 2008.

EL BOUSHY, A.R.; RATERINK, R. Egg yolk pigmentation. **World Review of Animal Production**, v. 27, n. 1, p. 49-62, 1992.

FENNEMA, O.R.; PARKIN,K.L.; DAMODARAN, S. **Química de Alimentos de Fennema**, 4 ed. Porto Alegre. Artmed, 2010.

FONSECA, R. A. S., BURKERT, J. F. M. KALIL,S. J. BURKERT, C. A. V.,Seleção de linhagem de *Phaffia rhodozyma* para produção de astaxantina, **XXI Congresso de Iniciação Científica e Tecnológica em Engenharia**, VI Feira de Protótipos, CRICTE, Rio Grande do Sul,2006

FRENCH-DAVIS , RICARDO. DEBTY-EQUITY swaps in Chile. *Cambridge Journal of Economics*, Salem, Massachusetts, Clearence Center, Inc., v. 14, n. 1,1990.\_\_\_\_. Export Dynamism and Growth since the 1980s. In: \_\_\_\_\_. *Economic reforms in Chile: from dictatorship to democracy*, Michigan, EUA: **Michigan Press**, 2002, 263 p.

GEDIK, C.M., EWEN, S.W.B., COLLINS, A.P. Single-cell electrophoresis applied to the analysis of UV - C damage and its repair in human cells. **Int. J. Radiat. Biol.** v.62, p.313-320, 1992.

GOTO,S. et al. Efficient radical trapping at the surface and inside the phospholipid membrane is responsible for highly potent antiperoxidative activity of the carotenoid astaxanthin. **Biochim Biophys Acta** v. 1512, p. 251-258, 2001.

GOUVEIA, L.; GOMES, E.; EMPIS, J. Potential use of microalgae (*Chlorella vulgaris*) in the pigmentation of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) muscle. **Lebensmittel-Untersuchung und- Forschung**, v. 202, p. 75-79, 1996.

GROSS, J.; *Pigments in vegetables: chlorophylls and carotenoids*, **Van Nostrand Reinhold: New York**, 1991.

HARTMANN, A., SPEIT, G. The contribution of cytotoxicity to DNA - effects in the single cell gel test (comet assay). **Toxicology Letters**, v.90, p.183-188, 1997

HENDERSON, L. et al. The ability of the comet assay to discriminate between genotoxins and cytotoxins. **Mutagenesis**, v. 13, p. 89-94, 1998.

HIGUERA-CIAPARA, I.; FÉLIX-VALENZUELA, L.; GOYCOOLEA, F.M. Astaxanthin: a review of its chemistry and applications. **Critic. Rev. Food Sci. Nutr.**, v. 46, p. 185-196, 2006.

HU, Z. C.; ZHENG, Y. G.; WANG, Z.; SHEN, Y. C.; pH control strategy in astaxanthin fermentation bioprocess by *Xanthophyllomyces dendrorhous* **Enzyme Microb. Technol.** vol. 84, p. 164-166, 2006.

HUDON, J. Biotechnological applications of research on animal pigmentation, **Biotechnology Advances**,v.12, p. 49-69, 1994.

HUSSEIN,G.,NAKAMURA,M.,ZHAO,Q., IGUCHI,T, GOTO,H.,SANKAWA,U., WATANABE.H. Antihypertensive and neuroprotective effects of astaxanthin in experimental animals. **Biol. Pharm. Bull**, v. 28, p. 47-52, 2005

KAJIMA, Y, INOKUCHI, Y, SHIMAZAWA, M, OTSUBO, K, ISHIBASHI, T, HARA, H; Astaxanthin, a dietary carotenoid, protects retinal cells against oxidative stress in-vitro and in mice in-vivo, **Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 60, p. 1365-1374, 2008

KANG, J.O., KIM, S.J, KIM, H. Effect of astaxanthin on the hepatotoxicity, lipid peroxidation and antioxidative enzymes in the liver of CCl<sub>4</sub>-treated rats. **Methods Find Exp Clin Pharmacol**. V.23, p. 79-84, 2001

KLAUDE, M. et al. The comet assay: mechanisms and technical considerations.**Mutat.Res.**, v.363, p.89-96, 1996.

KURASHIGE, M., OKIMASU, E., INOUE, M., UTSUMI, K., Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. Department of Medical Biology, Kochi Medical School, **Physiol Chem Phys Med NMR**, Japan, 1990

JOHNSON, E. A.; SCHROEDER W. A.; Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *Phafia rhodogma.*, **J. Biol. Chem**. p.270-374, 1995.

LATSCHA, T. Carotenoids - their nature and significance in animal feeds. **Basel: Hoffman-La Roche**, Ltd, 110p. 1990

LAWLOR, S.M., O'BRIEN, N.M. Astaxanthin: antioxidant effects in chicken embryofiblasts. **Nut Res**. v. 15, p. 1695- 1704, 1995.

LORENZ, R. T.,CYSEWSKI, G.R., Commercial potential for haematococcus Microalgae as a natural source of astaxanthin, **Tibtech april**, v. 18, 2000

LI, W et al. Alpha-Tocopherol and astaxantina decrease macrophage infiltration, apoptosis and vulnerability in atheroma of hyperlipidaemic. **J Mol Cell Cardio**. v.37, p. 969-978,2004

LIM, G-B; LEE, S-Y; LEE, E-K; HAAM, S-J; KIM, W-S. Separation of astaxanthin from red yeast *Phaffia rhodozyma* by supercritical carbon dioxide extraction. **Biochemical Engineering Journal**, v. 11, p. 181–187, 2002.

LIU, W.S., WU, J.Y. Hydrogen peroxide induced astaxantina biosynthesis and catalase activity in Xanthophy llomyces dendrorhous. **App IMicrobiol Cell Phys**. v. 73, p. 663-668,2006.

MARUSICH, W.L.; BAUERNFEIND, J.C. Oxycarotenoids in poultry feeds. In: BAUERNFEIND, J.C., (Ed). **Carotenoids as colorants and vitamin A precursors**. New York: Academic Press, .p. 319-462, 1981.

MCCOY, M. Astaxanthin market a hard one to crack. **Chemical and Engineering News**, v. 77, n. 14, p. 15-17, 1999.

MIDIO, A.F. & MARTINS, D.I. Toxicologia de alimentos. São Paulo, **Livraria Varela**, 2000.

MORIEL, D. G. et al. Effect of Feeding Methods on the Astaxanthin Production by *Phaffia rhodozyma* in Fed-Batchb Process. **Brazilian Archives Of Biology And Technology**, v. 48, n. 3, p. 397-401, 2005.

MULLER-FEUGA, A. Microalgae for aquaculture. In: RICHMOND, A. (Ed). Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology. **Oxford: Blackwell Science**, p.352–364. 2004.

NAGUIB, Y. M. A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. **Journal Agr.Food Chemistry**.v.48, p.1150-1154, 2000.

O'CONNOR, I., O'BRIEN, N. Modulation of UVA light-induced oxidative stress by  $\beta$ -carotene, lutein and astaxanthin in cultured fibroblasts. **J Dermatol Sci.** v. 16 , p. 226- 230, 1998.

OGAWA, M., MAIA, E. L., FERNANDES, A.C., NUNES, M.L., OLIVEIRA, M.E.B., FREITAS, S.T., Waste from the processing of farmed shrimp: a source of carotenoid pigments **Ciênc. Tecnol. Aliment., Campinas**, v. 27, p. 333-337, 2007

OLIVE, P. L. Cell proliferation as a requirement for development of contact effect in Chinese hamster V79 spheroids. **Radiat. Res.**, v.117, p.79-92, 1989.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. **Organização Mundial de saúde.** Perspectiva sobre análise de risco na segurança de alimentos. Rio de janeiro, 160, 2008

PALOZZA, P., KRINSKY,N.I. Astaxanthin and cantaxanthin are potent antioxidants in a membrane model. **Arch Biochem Biophys.** v. 297, p.184-187, 1992.

PASSOS, R. et al. Fontes naturais de carotenóides de interesse para a aqüicultura: análise comparativa da eficiência de métodos de extração. **Rev. Bras. Enga. Pesca**, v. 2, p. 103-113, 2007

PARAJÓ, J. C.; SANTOS, V.; VAZQUEZ, M. Optimization of carotenoid production by *Phaffia rhodozyma* cells grown on xylose. **Process Biochem.**, Oxford, v.33, p.181- 187, 1998.

PARK,J.S., CHYUN, J.H., KIM,Y.K, Larry L LINE,L.L., CHEW, B.P., Astaxanthin decreased oxidative stress and inflammation and enhanced immune response in humans, **Nutrition & Metabolism**, 2010.

PEREIRA, A.C.S.; MOURA, S.M.;CONSTANT, P.B.L., Alergia alimentar: sistema imunológico e principais alimentos envolvidos, **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde, Londrina**, v. 29, n. 2, p. 189-200, 2008

PONSANO, E.H.G.; PINTO, M.F.; GARCIA NETO, M.; LACAVA, P.M. Evaluation of *Rhodocyclus gelatinosus* biomass for broiler pigmentation. **Journal of Applied Poultry Research**, v. 11, n. 1, p. 77-82, 2002

POP N° 65.3330.011, ENSAIO Cometa. In: MANUAL da Qualidade. Rio de Janeiro: **INCQS/FIOCRUZ**. seção 10. (65.3330.011, rev. 06) 2012.

PRETTI, E. , CAVALCANTE, D. , SIMONATO, J.D., MARTINEZ, C.B.R., Ensaio do cometa e indução de anormalidades Eritrocíticas nucleares para detecção de Genotoxicidade e mutagenicidade no peixe Neotropical *prochilodus lineatus* expostos à Fração solúvel da gasolina, **Anais do VIII Congresso de Ecologia do Brasil**, Caxambu, MG, 2007

RAJASINGH, H., OYEHAUG,L., VAGE, D.I., OMHOLT, S.W., Carotenoid dynamics in Atlantic salmon. **BMC Biol.** v.4, p.1-15, 2006.

REYNDERS, M. B., RAWLINGS, D. E., HARRISON, S. T. L. Demonstration of the Crabtree effect in *Phaffia rhodozyma* during continuous and fed-batch cultivation. **Biotechnol. Lett.**, Middlesex, v. 19, n. 6, p. 549-552, 1997

RUSSEL, W.M.S. The Three Rs: past, present and future. **Animal Welfare**, v.14, p.279-86, 2005.

SANTOCONO, M., ZURRIA, M. , BERRETTINI, M., FEDELI, D., FALCIONI, G. Influence of astaxanthin, zeaxanthin and lutein on DNA damage and repair in UVA-irradiated cells, **Journal of Photochemistry and Photobiology**, Biology v. 85, p. 205–215, 2006.

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

SCHATZMAYR, H. G., MÜLLER, C. A., As interfaces da bioética nas pesquisas com seres humanos e animais com a biossegurança, **Ciênc. vet. tróp.**, Recife-PE, v. 11, suplemento 1, p.130-134, 2008

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Antioxidant role of carotenoids in *Phaffiarhodozyma*. **J Gen Microbiol.** v. 139, p. 907-902, 1993.

SCHROEDER, W. A.; JOHNSON, E. A. Singlet oxygen and peroxy radicals regulate carotenoid biosynthesis in *phaffiarhodozyma*. **J Biol Chem.** v. 270, p 18374-18379.1995

SINGH, N.P. et al. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells. **Exp. Cell. Res.**, v.175, p.184-191, 1988.

SPEIT, G.e HARTMANN, A. The Comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in Molecular Biology**, v. 314, p. 275-286, 2006.

TICE, R.R. et al. Single cell gel Comet assay: Guidelines for “in vitro” and “in vivo” genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

SQUINA, F.M.; MERCADANTE, A.Z. Análise, por CLAE de carotenóides de cinco linhagens de *Rhodotorula*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, vol. 39, p.309 – 318, 2003.

STREISSLE, G.; SCHWOBEL, W.; HEWLETT, G. Evaluation of antiviral compounds in cell cultures with acute or persistent virus infection. **Advanced Cell Culture**, V. 1, p. 67-90, 1981.

TAKAHASHI, J., TSUKAHARA, H., MINATO, S., Toxicological Studies of Astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*-Ames test, Oral Single Dose and 90-days Subchronic Toxicity Studies in Rats, **Journal of Clinical Therapeutics & Medicines**, v. 20; n°. 8; p. 867-881, 2004.

TICE, R., The Single Cell/ Comet Assay: A Microgel Eletroforetic Technique for the Detection of DNA Damage and Repair in Individual Cell. In: Phillips, D. H.; Vennit, S. (Eds.). **Environmental Mutagenesis**. **Bios Scientific Publishers Ltd**. Oxford, UK. p. 315-339, 1995.

TICE, R.R. et al. Single cell gel Comet assay: Guidelines for “in vitro” and “in vivo” genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, v. 35, p. 206-221, 2000.

TORRES, E.A. F, MACHADO, F. M. S. Alimentos em questão: uma abordagem tecnica para as dúvidas mais comuns. **São Paulo: Ponto Crítico**, 2001

TORRISEN, O. J. Strategies for Salmonid pigmentation. **J. Appl. Technol.**, n. 11, p. 276-278, 1995.

TOLASA, S, CAKLI, S, OSTERMEYER, U. Determination of astaxanthin and canthaxanthin in salmonid. **Eur Food Res Technol**. v. 221, p 787–791, 2005.

TRIPATHI, D.N, JENA, G.B. , Astaxanthin inhibits cytotoxic and genotoxic effects of cyclophosphamide in mice germ cells, Department of Pharmacology and Toxicology, **National Institute of Pharmaceutical Education and Research**, Sector-67, S.A.S. Nagar, Punjab 160062, India, 2008

TRIPATHI, D.N, JENA, G.B, Intervention of astaxanthin against cyclophosphamide-induced oxidative stress and DNA damage: A study in mice, Department of Pharmacology and Toxicology, **National Institute of Pharmaceutical Education and Research**, Sector-67, S.A.S. Nagar, Punjab 160062, India, 2009

TRIPATHI, D.N, JENA, G.B, Astaxanthin intervention ameliorates cyclophosphamide-induced oxidative stress, DNA damage and early hepatocarcinogenesis in rat: role of Nrf2, p53, p38 and phase-II enzymes. **Mutat Res**. Feb;69 , p. 669-80, 2010

UCHIYAMA,K., NAITO, Y., HASEGAWA , G., NAKAMURA,N., TAKAHASHI J., YOSHIKAWA T. Astaxanthin protects beta-cells against glucose toxicity in diabetic db/db mice. **Redox Report.**, 2002.

WILLIAMS, W.D. Origin and impact of color on consumer preference for food. **Poultry Science**, v. 71, n. 4, p. 744-746, 1992.

WITTE, I. et al. Genetic toxicity assessment: employing the best science for human safety evaluation part III: the comet assay as an alternative to “in vitro” clastogenicity tests for early drug candidate selection. **Toxicol. Sci.**, v. 97, p.21-26, 2007

WU, T et. Al. Astaxantina protects against oxidative stress and calcium-induced porcine lens protein degradation. **J Agric Food Chem.** v..54, p.2418-2423, 2006.

VALDUGA, E., TASTSCH, P. O., TIGGEMANN, L., TREICHEL, H. TONIAZZO, G., ZENI, J. Di LUCCIO, M. Produção de carotenóides: microrganismos como fonte de pigmentos naturais. **Quim. Nova**, v. 32, No. 9, 2429-2436, 2009.

VIJAYALAXMI, TICE, R.R., STRAUSS, G.H.S. Assessment of radiation - induced DNA damage in human blood lymphocytes using the single - cell gel electrophoresis technique. **Mutat. Res.**, v. 271, p.243-252, 1992

## Anexo 1

- Solução salina tamponada de fosfato sem cálcio e magnésio (PBS);

Cloreto de sódio	PM 58,44	32,0g
Cloreto de potássio	PM 74,55	0,8 g
Fosfato de sódio dibásico	PM 141,96	4,6g
Fosfato de potássio monobásico	PM 136,09	0,8g
Água desionizada	Qsq	4,0L

- Dissolver com agitação magnética;
- Ajustando o pH a aproximadamente 7,4 com ácido clorídrico 1N ou hidróxido de sódio 1N;
- Esterilizar por autoclavação durante 30min. Pode-se também esterilizar por filtração a vácuo (membrana de 0,22 $\mu$ m)

- Solução tampão alcalina para eletroforese (NaOH 300mM /EDTA 1mM);

a) Solução de hidróxido de sódio (10N):

Hidróxido de sódio	PM 40	40g
Água desionizada	9.	100mL

- em capela química, adicionar lentamente a água ao pó em béquer;
- após cada adição, resfriar o béquer em banho de gelo;
- usar a solução no prazo máximo de 2 semanas após a sua preparação;
- manter à temperatura ambiente

b) Solução de EDTA 200mM:

EDTA dissódico	PM 372,24	14,89g
Água desionizada	10.	200mL

- Dissolver com agitação magnética;
- Ajustar o pH da solução a aproximadamente 10 usando NaOH 10N;
- Manter a temperatura ambiente

c) Solução tampão:

Hidróxido de sódio 10N	11.	45mL
EDTA dissodico 200mM	12.	7,5mL
Água desionizada	Qsq	1500mL

- misturar até completa dissolução;
- o volume de 1500mL corresponde ao volume total a se preparado para uma corrida eletroforética;
- preparar no dia do experimento em manter em geladeira pelo menos 2h antes d o seu uso ou preparar a solução com água previamente resfriada em geladeira por pelo menos 2h

• Solução de lise

a) Solução de lise 1:

Cloreto de sódio 2,5 M	PM 58,44	146,1g
EDTA dissodico 100mM	PM 372,24	37,2g
Tris 10 mM	PM 121,14	1,2g
Água desionizada	Qsq	1000 mL

- dissolver com agitação magnética em torno de 850 mL de água;
- antes da solubilização completa, adicionar 8 a 9 g de hidróxido de sódio sólido para ajustar pH em torno de 10;
- dissolver com agitação magnética;
- caso o pH esteja acima de 10 adicionar ácido clorídrico 10N;
- se for necessário, adicionar solução de hidróxido de sódio 1N para o ajuste do pH em torno de 10;
- adicionar com agitação magnética 10g de sarcosinato de lauroilê sódico (Sigma L-5125;PM 293,4) para obter a concentração final de 1% m/v;
- completar o volume final a 1000 mL com água desionizada;
- manter a solução a temperatura ambiente.

b) Solução de lise 2 (final):

Triton -X 100	PM 646,87	1mL
DMSO	PM 78,13	10mL
Solução de lise 1	Qsq	100mL

- preparar a solução no dia do experimento;
- manter na geladeira (4 a 10°C) por pelo menos 60 min antes do uso

- Solução tampão para neutralização:

Tris 0,4M	PM 121,14	48,5g
Água desionizada	Qsq	1000mL

- dissolver com agitação magnética;
- ajustar o pH para cerca de 7,5 com ácido clorídrico concentrado;
- manter a temperatura ambiente

- Solução corante de brometo de etídio 200 µg /ml – (10X concentrada);

a)

Brometo de etídio	PM 394,3	0,005g
Água desionizada	13.	25mL

- dissolver até completa dissolução;
- manter á temperatura ambiente
- b) página 12....POP

- Solução corante de diacetato de fluoresceína(FDA) e brometo de etídio:

a) Solução A – FDA (sigma F-7378) 5mg/mL

FDA	PM 416,4	0,025g
Acetona	14.	5mL

- dissolver até completa dissolução;
- manter à temperatura

b) Solução B – Brometo de etídio (Sigma - 8751) 200µg/mL

Brometo de Etídio	PM 394,3	0,005g
Solução PBS	15.	25mL

- dissolver até completa dissolução;
- manter à temperatura ambiente

c) Solução de FDA 30µg/mL e de Brometo de etídio 8µg/mL

Solução A	30µL
Solução B	200µL
Solução PBS	4,8µL

- preparar no dia do teste para determinação da viabilidade celular;
- adicionar 100µL da solução corante a 100µL de suspensão celular;
- adicionar 50µL à lamínula microscópica e cobrir com lamínula;
- analisar pelo menos 200 células por concentração ou dose testada em microscópio de fluorescência a um aumento de 200X ou 400X
- as células viáveis mostram fluorescência verde enquanto núcleos corados em laranja indicam células mortas;
- células perdendo a viabilidade contêm grânulos citoplasmáticos verdes e um núcleo laranja;
- expressar o resultado como percentual de citotoxicidade ou percentual de células mortas;

• Solução de Metil metano sulfonado (MMS – 800 µM):

MMS	Aldrich 12,992-5	PM 110,13	d = 1,300
-----	------------------	-----------	-----------

a) Solução A MMS -  $8 \times 10^{-2}$  M (80mM)

MMS	20µL
PBS	3mL

- adicionar 20µL de MMS com micropipeta a um tubo contendo 3mL de PBS
- dissolver o MMS o homogenizar a solução com micropipeta de 1mL com ponteira azul

b) Solução B MMS -  $8 \times 10^{-4}$  M (0,8mM)

Solução A	10µL
-----------	------

PBS	990 $\mu$ L
-----	-------------

- Empregar tubo de microcentífuga de 1,5mL para a dissolução

Notas:

- Incubou durante 2h a  $37\pm 1^{\circ}\text{C}$ ;