

**Scientific Electronic Archives**

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 16 (5)

May 2023

DOI: <http://dx.doi.org/10.36560/16520231697>

Article link: <https://sea.ufr.edu.br/SEA/article/view/1697>



## Avaliação antioxidante e mutagênica do extrato aquoso de cupuaçu em animais expostos a ciclofosfamida

### Antioxidant and mutagenic evaluation of cupuaçu aqueous extract in animals exposed to cyclophosphamide

**Andrielli Pompermayer Rosa**

Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop

**Suzana Dockhorn**

Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop

**Larissa Magnani**

Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop

**Marina Mariko Sugui**

Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop

*Corresponding author*

**Valéria Dornelles Gindri Sinhorin**

Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop

[valeria.sinhorin@ufmt.br](mailto:valeria.sinhorin@ufmt.br)

**Resumo:** O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.) é um fruto comestível e originário da região Amazônica brasileira, sendo hoje encontrado em várias partes do mundo. A polpa, bem como a semente, apresenta em sua composição compostos que possuem influência sobre fatores biológicos e conseqüentemente, podem apresentar efeitos preventivos contra algumas doenças. O estudo teve como objetivo avaliar o efeito protetor do cupuaçu como antioxidante nos tecidos (fígado e cérebro) e na medula óssea de camundongos machos *Swiss*, através da inibição da mutagenicidade induzida pelo agente alquilante ciclofosfamida (CPA). O extrato aquoso *in natura* do cupuaçu (EAC) foi usado para os testes *in vivo* de biomarcadores de estresse oxidativo (superóxido dismutase, catalase, glutatona-S-transferase, glutatona reduzida, ácido ascórbico e carbonilação de proteínas) e do micronúcleo para a avaliação do potencial antimutagênico/mutagênico. Os animais (n= 6 /grupo) foram tratados por 15 dias consecutivos com EAC (via gavagem) e no 15º dia receberam intraperitonealmente NaCl (0,9%) ou CPA (25 mg/Kg), sendo sacrificados 24 horas após o tratamento para avaliação dos parâmetros acima citados e da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE). Os resultados mostraram que o pré-tratamento por 15 dias com o EAC somente aumentou a atividade da superóxido dismutase cerebral e na presença da CPA houve redução desta atividade no fígado. Esta dose de CPA não promoveu alterações *per se* no status redox, porém o extrato não reduziu a frequência de MNPCE induzida pela CPA, quando comparado com o grupo controle positivo. Ainda, o grupo tratado somente com a polpa não mostrou efeito mutagênico. Diante dos resultados foi possível verificar que o cupuaçu não apresentou atividade antimutagênica/mutagênica e ainda que o processo de congelamento das amostras pode ter interferido nas respostas frente aos parâmetros bioquímicos do status redox avaliados.

**Palavras-chave:** *Theobroma grandiflorum* S., Antimutagenicidade, Teste de micronúcleo, Ciclofosfamida, Camundongos *Swiss*

**Abstract:** Cupuaçu (*Theobroma grandiflorum* S.) is an edible fruit originating in the Brazilian Amazon region, and is now found in several parts of the world. The pulp, as well as the seed, has compounds in its composition that have an influence on biological factors and, consequently, may have preventive effects against some diseases. The study aimed to evaluate the protective effect of cupuaçu as an antioxidant in tissues (liver and brain) and bone marrow of male *Swiss*

mice, through the inhibition of mutagenicity induced by the alkylating agent cyclophosphamide (CPA). The *in natura* aqueous extract of cupuaçu (EAC) was used for the tests *in vivo* of biomarkers of oxidative stress (superoxide dismutase, catalase, glutathione-S-transferase, reduced glutathione, ascorbic acid and protein carbonylation) and of the micronucleus for the evaluation of the antimutagenic/mutagenic potential. The animals (n=6/group) were treated for 15 consecutive days with EAC (via gavage) and on the 15th day they received intraperitoneally NaCl (0.9%) or CPA (25 mg/kg), being sacrificed 24 hours after treatment to evaluate the parameters mentioned above and the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE). The results showed that pre-treatment for 15 days with EAC only increased brain superoxide dismutase activity and in the presence of CPA there was a reduction of this activity in the liver. This dose of CPA did not promote changes per se in the redox status, but the extract did not reduce the frequency of CPA-induced MNPCE when compared to the positive control group. Furthermore, the group treated with pulp alone did not show a mutagenic effect. In view of the results, it was possible to verify that cupuaçu did not present antimutagenic/mutagenic activity and that the freezing process of the samples may have interfered in the responses to the biochemical parameters of the redox status evaluated.

**Keywords:** *Theobroma grandiflorum* S., Antimutagenicity, Micronucleus test, Cyclophosphamide, Swiss mice

## Introdução

A ciclofosfamida (CPA), sintetizada por Arnold e Bourseaux, em 1958 (*apud.* AU et al., 1980) se tornou o agente neoplásico e imunossupressor mais utilizado para tratar doenças do sistema imunológico (Ghosh et al., 2015). Não está explícito qual mecanismo é o responsável pelas lesões hepáticas causadas pela CPA, no entanto, sabe-se que a ativação e a metabolização desse composto ocorrem através de microsomas hepáticos, gerando dois produtos finais: a fosforamida mostarda e acroleína (Araújo et al., 2015). Esta última, está associada à capacidade de induzir a formação das espécies reativas de oxigênio (EROs), as quais, por sua vez, acabam prejudicando o fígado, órgão responsável pela metabolização da CPA (Araújo et al., 2015; Liu et al., 2012). Estudos feitos por Luiz e colaboradores (2020) mostraram que a CPA administrada em camundongos na dose de 75 mg/kg causa alterações na atividade das enzimas antioxidantes, antioxidantes não enzimáticos e marcador de lipoperoxidação hepática, transaminases, parâmetros hematológicos e eritrócitos policromáticos micronucleados.

Dentre os agentes que vêm sendo avaliados quanto ao potencial quimioprotetor frente aos efeitos colaterais causados pelo estresse oxidativo, o fruto cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*, S.) tem despertado especial atenção devido seu potencial econômico e valores nutricionais (Silva et al., 2007) e por possuir em sua composição química compostos com perfil antioxidante (Kuskoski et al., 2005).

O cupuaçu (*Theobroma grandiflorum*) é um fruto nativo da Amazônia, mais especificamente do estado do Pará, Rondônia, Acre e algumas regiões do estado do Maranhão, cujo nome trata-se de uma composição derivada da língua Tupi. Esse fruto também é conhecido, no Brasil, como cupu, pupu e pupuaçu, sendo de grande importância econômica para região Norte, demonstrando inclusive, tendência expansionista no cultivo dessa cultura (Souza et al., 2017; Pereira et al., 2018).

O fruto é muito apreciado, tanto *in natura*, como em polpas, geleias, iogurtes e outras sobremesas, seja pelo seu sabor acidificado ou pelos seus valores nutricionais, tal como a vitamina

C que tem função antioxidante (Vriesmann; Petkowicz, 2009), polifenóis incluindo flavonas, flavan-3-ols e proantocianidinas (Pugliese et al., 2013). Além disso, o cupuaçu apresenta uma polpa rica em diversos minerais, como o ferro, cálcio e fósforo, e suas sementes são fonte de cálcio, zinco, magnésio, potássio, ferro e fósforo (Souza et al., 2017; Pugliese et al., 2013). Já a semente do fruto contém uma grande quantidade de lipídeos e estudos confirmam a presença de alcaloides tais como teobromina, cafeína e xantina (Yang et al., 2003).

O estresse oxidativo pode ser causado pela diminuição das defesas antioxidantes, bem como aumento das EROs, as quais, por sua vez, têm importância fisiológica na defesa contra agentes infecciosos e sinalização celular. No entanto, em altas concentrações podem desencadear problemas como alterações hepáticas, além de elevar marcadores inflamatórios como o TNF- $\alpha$  e IL-6 (Ezhilarasan, 2018; Luangmonkong et al., 2018; Punaro et al., 2019).

Considerando a relevância e importância regional do fruto associado aos casos de patologias como mencionado acima, em especial nos estados onde o fruto agrega valor econômico e, devido aos componentes presentes no fruto que contribuem para melhora da saúde, este estudo objetivou mostrar se a ingestão por 15 dias da polpa de cupuaçu em camundongos *Swiss* pode contribuir na prevenção dos danos que a droga mutagênica (CPA) causa devido as alterações geradas por ela nos biomarcadores do estresse oxidativo.

## Material e Métodos

### *Delineamento Experimental*

Foram utilizados 36 camundongos *Swiss* machos, com 6 semanas de idade e peso médio de 25 g. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEUA)-UFMT pelo número de protocolo 23108.782134/12-9. Os frutos de cupuaçu foram adquiridos junto a uma propriedade rural, no município de Sinop/MT. A extração do suco (polpa + semente) foi obtida através da liquidificação (100 g da amostra e diluída em 200 mL de água filtrada) para a obtenção do extrato aquoso e, posteriormente, a mistura foi peneirada. Os extratos aquosos do cupuaçu (EAC)

foram estocados em freezer à temperatura de -18 °C e descongelados, no momento do uso, em banho-maria à 37 °C. Durante todo o período experimental, os animais permaneceram sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2$  °C), umidade relativa ( $55 \pm 10\%$ ), ciclo de luz (12 horas claro/escuro), exaustão e recebendo ração comercial peletizada e água filtrada *ad libitum*. O período de aclimação foi de 2 semanas. A CPA foi

fornecida pela Baxter e diluída em solução salina 0,9% e administrada aos animais intraperitonealmente, na concentração de 25 mg/kg p.c (0,1 mL/10 g p.c.). O extrato foi administrado via gavagem numa concentração correspondente a 16,8 mg/cupuaçu/animal (0,3 mL/animal). Os animais foram divididos em 4 grupos com 6 animais cada, como mostra o Quadro 1.

**Quadro 1.** Grupos e tratamentos conforme a via de administração

Grupos	Tratamento por 15 dias (via gavagem)	Tratamento no 15º dia (via intraperitoneal)
G1. Controle negativo	Água	NaCl 0,9% (0,1 mL/10 g p.c.)
G2. Controle positivo	Água	CPA (25 mg/kg p.c.)
G3. Extrato aquoso de cupuaçu (EAC)	EAC	CPA (25 mg/kg p.c.)
G4. Extrato aquoso de cupuaçu (EAC)	EAC	NaCl 0,9% (0,1 mL/10 g p.c.)

Os animais foram pesados no início e no final do experimento, assim como a quantidade de ração ingerida. Todos os camundongos foram anestesiados com ketamina (50 mg/kg), tiveram seus tecidos (cérebro e fígado) removidos e congelados a -85 °C para realização das análises bioquímicas de Superóxido Dismutase (SOD), Catalase (CAT), Glutaciona-s-Transferase (GST), Glutaciona Reduzida (GSH), Ácido Ascórbico (ASA) e Proteínas Carboniladas (Carbonil).

#### Teste de Micronúcleo

Além dos tecidos também foi extraído o fêmur dos animais para a quantificação de células micronucleadas a partir da medula óssea. O preparo e obtenção das lâminas de eritrócitos de medula óssea para avaliação da frequência de micronúcleo (MN) seguiram a metodologia proposta por MacGregor et al. (1987). Foram analisados 2000 eritrócitos policromáticos (PCEs) por animal em microscópio de luz (1000/lâmina), com aumento de 1000 vezes (imersão) para o registro da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (PCEMNs), sendo que, para cada animal foram preparadas duas lâminas, ambas codificadas em teste cego.

#### Parâmetros Bioquímicos

A atividade da superóxido dismutase (SOD) foi medida no fígado e cérebro dos animais e esta análise se baseia na inibição da reação do radical superóxido com bitartarato de adrenalina, como descrito por Misra & Fridovich (1972). Neste método, a SOD, presente na amostra, compete com o sistema de detecção para o radical superóxido. Uma unidade da enzima SOD é definida como a quantidade de enzima que inibe a velocidade de oxidação de 50% de bitartarato de adrenalina. A SOD foi determinada pela medição da velocidade de formação de adrenocromo, como observado a 480 nm, em um meio de reação contendo glicina-NaOH (50 mM, pH 10,0) e epinefrina (1 mM). A atividade foi expressa em UI SOD mg de proteína<sup>-1</sup>.

A atividade da glutaciona-S-transferase (GST) foi avaliada no fígado, segundo método desenvolvido por Hagib et al. (1974). Por sua vez, foi determinada a partir da adição do reativo 1-cloro-2,4 dinitrobenzeno (CDNB), o qual na presença da glutaciona forma GS-dinitrobenzeno (GS-DNB), com leitura no espectrofotômetro na faixa de 340 nm e atividade expressa em  $\mu\text{mol GS-DNB min mg proteína}^{-1}$ .

A atividade da catalase (CAT) foi avaliada de acordo com Nelson & Kiesow (1972) e a mudança na absorção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em 60 s foi medida espectrofotometricamente em 240 nm. A atividade da CAT no tecido hepático foi calculada e expressa em  $\text{nmol min}^{-1}\text{mg proteína}^{-1}$ .

Os antioxidantes não enzimáticos glutaciona reduzida (GSH) foi determinado pelo método de Sedlack & Lindsay (1968) e ácido ascórbico (ASA) pelo método de Roe (1954). Amostras do fígado e do cérebro foram usadas para a determinação de GSH e a formação do ânion tiolato foi determinada a 412 nm por comparação com uma curva padrão de GSH e, posteriormente, expressa em  $\mu\text{mol GSH mg proteína}^{-1}$ . Já os níveis de ASA dosados no fígado foram expressos em  $\mu\text{mol ASA g}^{-1}$  de tecido e comparados a uma curva padrão de ASA. A determinação da carbonilação de proteínas nos dois tecidos foi realizada segundo Yan et al. (1995) e a quantidade de proteínas carboniladas foi identificada após leitura em 370 nm e expressa em  $\text{nmol de carbonil mg proteína}^{-1}$ .

O conteúdo proteico das amostras (exceto para a ASA) foi determinado pelo método de Bradford (1976) usando uma curva de albumina bovina como padrão e as amostras foram lidas em 595 nm.

#### Análise Estatística

O teste para verificação da normalidade dos dados e homogeneidade das variâncias foi realizado para a determinação da análise mais adequada. Assim, os resultados foram expressos como média e erro padrão ou mediana e intervalo interquartil, para as análises estatísticas

paramétricas (ANOVA seguida pelo *post hoc* teste de Tukey) ou não-paramétricas (Kruskal-Wallis seguido pelo *post hoc* teste de Dunn), respectivamente para verificar as diferenças entre os grupos experimentais. Em todos os casos foi estabelecido um nível de significância para rejeição da hipótese de nulidade de 5% ( $p < 0,05$ ).

A frequência de células micronucleadas nos diferentes grupos experimentais foi analisada

$$\% \text{ de redução} = \frac{\text{Frequência de MN em A} - \text{frequência de MN em B} \times 100}{\text{Frequência de MN em A} - \text{frequência de MN em C}}$$

Na qual, A corresponde ao grupo tratado com CPA (controle positivo); B corresponde ao grupo tratado com extrato aquoso do cupuaçu + CPA e C corresponde ao grupo tratado com NaCl 0,9% (controle negativo).

## Resultados e Discussão

### Avaliação ponderal

A Tabela 1 apresenta o peso corpóreo médio (g) e ganho de peso (média  $\pm$  SD) dos camundongos, os quais foram tratados durante 15 dias com EAC. Os grupos tratados não apresentaram diferença quanto ao ganho de peso, havendo, inclusive, perda de peso durante o período de tratamento. Isso pode ser resultado de fatores estressantes, ou ainda consequência natural da alimentação e tratamentos realizados.

pelo teste qui-quadrado (PEREIRA, 1991) e, posteriormente, a porcentagem de redução na frequência de MN foi calculada seguindo o método de Manoharan e Banerjee (1985) e Water e colaboradores (1990), por meio da fórmula:

A Tabela 2 representa o consumo médio de ração em função do pré-tratamento com o EAC (via gavagem) durante o período experimental de 15 dias. Nota-se que os grupos tratados com o EAC não mostraram efeito em relação ao consumo de ração quando comparado com o grupo controle negativo. Por outro lado, há uma redução no peso corpóreo dos animais tratados com o EAC em relação ao grupo controle negativo. Embora a semente do cupuaçu seja rica em gorduras e outras propriedades, assemelhando-se ao cacau, pode-se sugerir que o cupuaçu é saciogênico devido à concentração de pectina, isto é, não se faz necessário um grande consumo para gerar saciedade (Villachica, 1996; Pereira et al., 2018).

**Tabela 1-** Peso corpóreo médio (g) e ganho de peso (média  $\pm$  SD) de camundongos machos após pré-tratamento com extrato aquoso do cupuaçu por 15 dias e a administração de CPA no 15º dia.

Tratamento	n	Peso inicial X $\pm$ SD (g)	Peso final X $\pm$ SD (g)	Ganho de peso X $\pm$ SD (g)
G1 <sup>a</sup>	6	42,10 $\pm$ 4,68	41,75 $\pm$ 3,86	-0,35 $\pm$ 1,55
G2 <sup>b</sup>	6	36,38 $\pm$ 2,49	36,21 $\pm$ 2,26	-0,06 $\pm$ 0,62
G3	6	36,06 $\pm$ 2,60	32,66 $\pm$ 3,20	-3,41 $\pm$ 0,77
G4 <sup>c</sup>	5	38,80 $\pm$ 7,41	34,60 $\pm$ 6,65	-4,20 $\pm$ 4,29

<sup>a</sup> Controle negativo; <sup>b</sup> Controle positivo; <sup>c</sup> um animal morreu

**Tabela 2-** Consumo médio de ração e *Theobroma grandiflorum* S. (peso seco) por camundongos machos após pré-tratamento com extrato aquoso do cupuaçu por 15 dias e a administração de CPA no 15º dia.

Tratamento	n	Consumo da ração (g/animal/dia) X $\pm$ SD	Peso corpóreo (g) X $\pm$ SD	<i>Theobroma grandiflorum</i> (mg/animal/dia)
G1 <sup>a</sup>	6	4,58 $\pm$ 0,88	41,92 $\pm$ 0,24	-
G2 <sup>b</sup>	6	4,55 $\pm$ 2,04	36,29 $\pm$ 0,12	-
G3	6	4,16 $\pm$ 1,23	34,36 $\pm$ 2,40	16,8
G4 <sup>c</sup>	5	3,55 $\pm$ 0,96	36,70 $\pm$ 2,96	16,8

<sup>a</sup> Controle negativo; <sup>b</sup> Controle positivo; <sup>c</sup> um animal morreu.

### Análise do Teste de Micronúcleo

A Tabela 3 apresenta o efeito do EAC sobre danos no DNA, quimicamente induzidos pela ciclofosfamida (CPA), em camundongos pré-tratados com o extrato aquoso *in natura* do cupuaçu. Os resultados demonstraram que a CPA apresentou efeito mutagênico, pois aumentou a MNPCs. Porém, no grupo 3, o qual foi tratado com o extrato aquoso do cupuaçu (polpa + semente) e a

CPA, não reduziu significativamente a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de medula óssea, quando comparado com o grupo controle positivo. Assim, o EAC não apresentou atividade antimutagênica e tampouco mutagênica, pois o grupo 4 não foi estatisticamente diferente do controle.

**Tabela 3-** Frequência de MNPCs em medula óssea de camundongos *Swiss* machos após pré-tratamento com extrato aquoso do cupuaçu por 15 dias e a administração de CPA no 15º dia.

Tratamentos	Nº de células analisadas	MNPCEs		% de Redução
		Nº	%	
G1 <sup>a</sup>	12.000	82	0,68	
G2 <sup>b</sup>	12.000	204	1,70	
G3	12.000	198	1,65	4,91
G4 <sup>c</sup>	10.000	70	0,70	

<sup>a</sup> Controle negativo; <sup>b</sup> Controle positivo; <sup>c</sup> um animal morreu. Teste qui-quadrado; N=6.

Já em um estudo realizado por Spada et al. (2008) em testes com linhagens de células de *Saccharomyces cerevisiae*, observaram atividade antimutagênica do cupuaçu, ao investigar o efeito antioxidante, mutagênico e antimutagênico de 23 amostras de polpas congeladas de frutas. Embora existam estudos que comprovam as propriedades nutricionais e terapêuticas do cupuaçu, bem como seus efeitos biológicos na prevenção de diversas doenças, estudos na área de quimioprevenção do câncer são escassos, bem como o conhecimento acerca das propriedades de possíveis tratamentos do câncer com esse fruto isolado.

Por outro lado, segundo Malavolta (1998), um bom plantio, contendo adubação e manejo adequados, manifesta-se na produção e qualidade do fruto, e por consequência nos metabólitos presentes. Pugliese et al. (2013) observaram em seus estudos que as polpas congeladas de cupuaçu apresentaram quantidades menores de flavonoides, proantocianinas e ácido ascórbico quando comparadas a polpa fresca, sugerindo que estes componentes, também presentes na semente, podem ser potencialmente degradados durante o processamento ou a estocagem. Desse modo, uma hipótese é a de que esses requisitos necessários para o desenvolvimento do fruto influenciaram no resultado observado neste estudo, uma vez que, o cupuaçu em questão foi obtido de uma região rural onde esses cuidados e especificações provavelmente não estavam presentes e, posteriormente, o EAC foi processado e congelado devido ao fato de ser inviável seu uso fresco.

Assim, os resultados obtidos da avaliação do efeito do cupuaçu sobre a clastogenicidade induzida pelo agente alquilante CPA, *in vivo*, nas condições experimentais utilizadas, sugerem que o EAC possui compostos que não reduziram significativamente a frequência de células micronucleadas da medula óssea de camundongos *Swiss*. Ainda, é possível que os compostos ativos poderiam estar presentes em quantidades insuficientes para um efeito protetor do DNA contra os danos causados pela CPA.

#### Análises Bioquímicas

Na análise da atividade da SOD no fígado dos camundongos foi observada uma significativa redução da atividade enzimática do grupo G3 quando comparado aos grupos G1 e G4 (figura 1A). É notável, embora não observado estatisticamente,

uma tendência a redução da atividade da SOD no grupo CPA (G2), o que nos sugere que se o número de animais usados no estudo fosse maior, teríamos observado esta diferença. A presença de CPA juntamente ao extrato fez com que a atividade da SOD fosse reduzida. Por outro lado, quando observamos a ausência de CPA (G4) a atividade da SOD retorna aos níveis do controle. Portanto, estes achados nos faz sugerir que a queda na atividade da enzima se deu pela CPA e que o EAC não teve substâncias antioxidantes suficientes para modificar este parâmetro em questão e isto se confirma pois o G4 apresentou médias semelhantes ao controle.

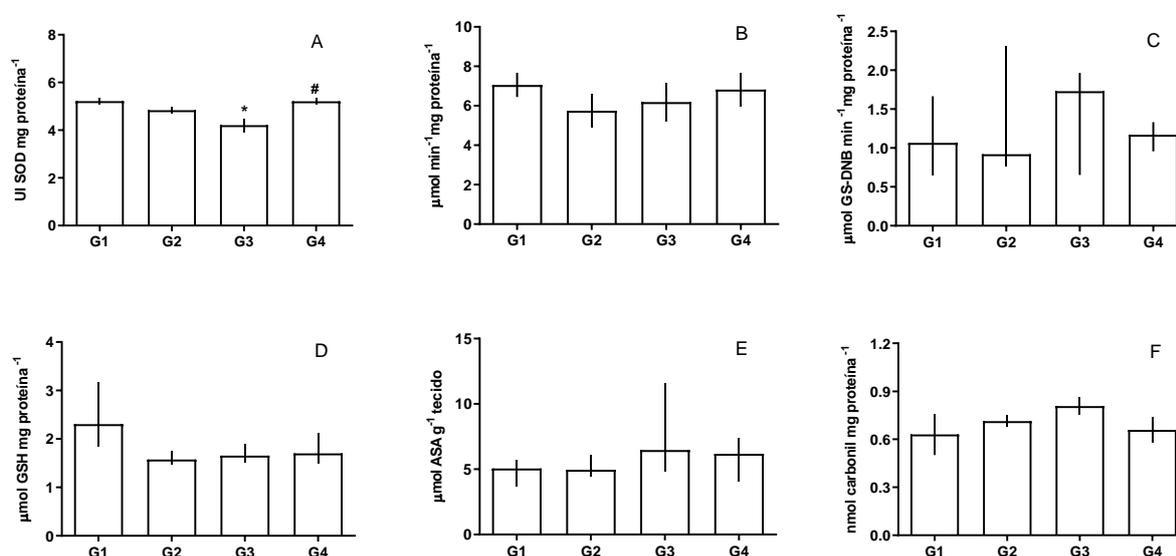
Da mesma forma, observamos uma tendência a redução na atividade da CAT (figura 1B) e para o antioxidante não-enzimático GSH (figura 1D) frente ao grupo CPA em comparação ao grupo controle e uma tendência ao aumento nos grupos que contém CPA na análise de carbonilação de proteínas, um marcador de dano proteico (figura 1F). Como pode ser visto, as médias (CAT e carbonilação) e medianas (GSH) demonstraram alterações, porém não significativas em função do tamanho amostral. Ainda, exceto para as análises de GSH, nas análises de CAT, GST (figura 1C) e carbonilação de proteínas o grupo G4 mostrou um mesmo padrão de comportamento, se assemelhando aos valores do controle. Estudos feitos por Curimbaba et al. (2020) também não observaram mudanças nos níveis de GSH, porém foi em amostras de cólon de ratos tratados com ácido trinitrobenzeno sulfônico (TNBS).

Já na análise do antioxidante não enzimático, ácido ascórbico, em fígado de camundongos, há uma tendência ao aumento nos grupos que receberam o EAC (figura 1E). Estudos confirmam que o cupuaçu é conhecido por apresentar altos teores de ácido ascórbico ou vitamina C (Pereira et al., 2018).

O fígado é o órgão responsável pela metabolização da CPA, a qual gera a fosforamida mostarda que está envolvida na atividade antineoplásica e a acroleína que induz dano hepático ao gerar um estresse oxidativo, culminando em modificações de parâmetros de defesa antioxidante (Kern; Kehrer, 2002; Stankiewicz et al., 2002). Uma hipótese a ser considerada é que a dose de CPA não foi suficiente para causar alterações nos parâmetros do estresse oxidativo investigados. Estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa mostrou efeitos

semelhantes frente a esta dose de CPA (25 mg/kg) nas análises de CAT e ácido ascórbico além de também não alterar o TBARS (marcador de dano lipídico). Ainda nestes achados, viram aumento de carbonilação, porém o estudo foi conduzido com 8 animais por grupo (Barbosa et al., 2018). Já para outro estudo de nosso grupo de pesquisa, onde foi usada a dose de 75 mg/kg, foi possível ver uma redução de SOD, CAT, GST, GSH e aumento de TBARS no grupo CPA (Luiz et al., 2020). Ainda, Godoy et al. (2020) usaram uma dose de 100 mg/kg e foi também possível perceber mudanças nos parâmetros antioxidantes tais como redução em SOD, GST e GSH e TBARS. Por isso, podemos sugerir que a dose usada neste estudo não foi efetiva e o número amostral também não foi condizente para obtermos as diferenças estatísticas. Já para o efeito do EAC não ter sido

expressivo nesta investigação, é importante salientar que este fruto contém antioxidantes como ácido ascórbico, flavonoides e pro-antocianidinas (Pugliese et al., 2013). Segundo o autor, a concentração de ácido ascórbico presente na polpa do fruto é drasticamente reduzida no processo de pasteurização para a obtenção da polpa para comercialização. Além disso, a presença de flavonoides e pro-antocianidinas também são afetadas pelo processamento e as sementes frescas apresentam maiores quantidades destas substâncias. Contudo, em nosso estudo, a polpa e a semente foram utilizadas juntamente, passaram por um processo de trituração e esta mistura foi congelada, mudando provavelmente as características benéficas das moléculas antioxidantes ali presentes, refletindo assim nos resultados.

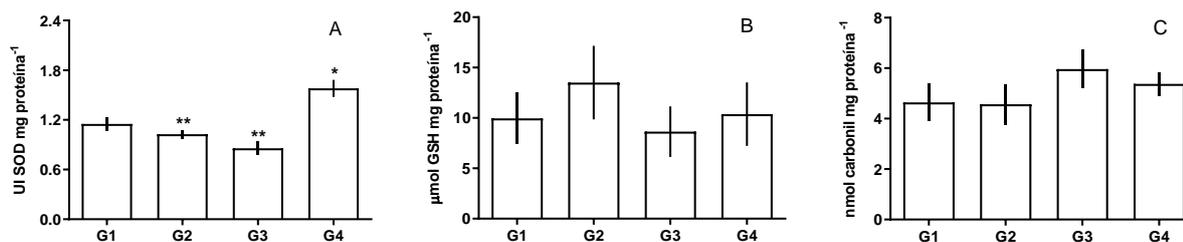


**Figura 1.** Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no tecido hepático. (A) SOD ; (B) Catalase ; (C) GST; (D) GSH; (E) ácido ascórbico; (F) Carbonil. (N = 6). Média ± erro padrão (A, B, F); mediana intervalo - interquartil (C, D, E). \* p < 0,0001 vs G1, # p < 0,05 vs G3.

Na atividade da enzima SOD cerebral, o grupo G4 apresentou aumento em relação aos grupos tratados com CPA (figura 2A). Na análise estatística observou-se uma interação entre os grupos de tratamento ( $F(1,20) = 13,50$ ;  $p < 0,0001$ ). A SOD é considerada uma das enzimas mais importantes no processo antioxidante (Ighodaro & Akinloye 2017). Ela tem a capacidade de fazer a dismutação do radical superóxido em peróxido de hidrogênio e oxigênio molecular. O cérebro é uma estrutura dependente de metabolismo aeróbico e rico em lipídeos contendo ácidos graxos poli-insaturados que são extremamente vulneráveis a oxidação (Nelson & Cox, 2011). Neste contexto, o aumento observado da atividade da SOD *per se* significa que neste tecido o extrato aquoso conseguiu apresentar um bom efeito antioxidante, aumentando a atividade

enzimática e se diferenciando dos grupos expostos a CPA.

Ainda, os níveis de GSH cerebral não foram modificados por nenhum tratamento, incluindo os do grupo 3 e 4, os quais foram tratados com EAC e na carbonilação de proteínas uma tendência a um aumento nestes grupos, mas que não puderam ser confirmados estatisticamente (figura 2B e 2C). Portanto, embora tenhamos encontrado uma resposta relevante para a SOD no cérebro, não foram encontrados outros estudos avaliando os efeitos deste fruto no tecido cerebral para possíveis comparações. E ainda, embora a CPA gere estresse oxidativo e culmine na formação de EROs e estas possam ser conduzidas também ao cérebro e causar alterações em lipídeos e proteínas de membrana, por exemplo, a dose usada não foi efetiva para gerar tais danos.



**Figura 2.** Parâmetros bioquímicos do estresse oxidativo no tecido cerebral. (A) SOD ; (B) GSH; (C) Carbonil. (N = 6). Média ± erro padrão (A, B, C); \* p < 0,05 vs G1, \*\* p < 0,05 vs G4.

## Conclusões

Conclui-se que a SOD apresentou alterações tanto no fígado quanto no cérebro e o cupuaçu não demonstrou o potencial antioxidante inicialmente esperado, embora tenha modulado a atividade da SOD no cérebro dos camundongos.

Em relação ao Teste de Micronúcleo, o extrato aquoso do cupuaçu administrado por 15 dias, mesmo possuindo compostos com características antioxidantes e fenólicas, não apresentou efeito antimutagênico, ou seja, os compostos ativos não foram capazes de reduzir a frequência de MNPCE induzida pela CPA. Por outro lado, o extrato aquoso do cupuaçu não apresentou potencial mutagênico.

O presente trabalho contribui para o nosso entendimento nesta área de estudo, explorando os potenciais compostos existentes na natureza que podem ter fácil acesso e bom custo benefício. Entretanto, por ainda existirem mecanismos desconhecidos acerca desse fruto, faz-se necessário maiores estudos, em relação ao modo que o cupuaçu se comporta frente aos antioxidantes, assim como estudos *in vitro* com a finalidade de verificar se é possível utilizar o cupuaçu na prevenção de danos ao DNA.

## Referências

ARAÚJO, É. S., GARCIA, R. S., DAMBRÓS, B., PIENIZA, S., SCHNEIDER, A., ABIB, R.T. Impact of vitamin C supplementation on lipid peroxidation and reduced glutathione levels in the liver tissue of mice with cyclophosphamide-induced immunosuppression. *Revista de Nutrição [online]*, v. 29, n. 04, p. 579-587, 2016. <https://doi.org/10.1590/1678-98652016000400012>

AU, W., SOKOVA, O. I., KOPNIN, B., ARRIGHI, F. E. Cytogenetic toxicity of cyclophosphamide and its metabolites in vitro. *Cytogenetics and Cell Genetics*, v. 26, p. 108-116, 1980. doi: 10.1159/000131432.

BARBOSA, F. G., SUGUI, M. M., SINHORIN, V. D. G., BICUDO, R. C., MOURA, F. R., SINHORIN, A. P. First phytochemical and biological study of the ethanolic extract from leaves of *Capirona decorticans* (Rubiaceae). *Acta Amazonica*, v. 48, p.

338-346, 2018. <https://doi.org/10.1590/1809-4392201703483>

BRADFORD, M. M. A. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: 10.1006/abio.1976.9999

CURIMBABA, T. F. S., ALMEIDA-JUNIOR, L. D., CHAGAS, A. S., QUAGLIO, A. E. V., HERCULANO, A.M., DI STASI, L. C. Prebiotic, antioxidant and anti-inflammatory properties of edible Amazon fruits. *Food Bioscience*, v. 36, p. 100599, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100599>

EVANS, H.J., SCOTT, D. The induction of chromosome aberrations by nitrogen mustard and its dependence on DNA synthesis. *Proceedings of the Royal Society B.*, v. 173, p. 491-512, 1969.

EZHILARASAN, D. Oxidative stress is bane in chronic liver diseases: Clinical and experimental perspective. *Arab Journal of Gastroenterology*, v.2, p. 56-64, 2018. doi: 10.1016/j.ajg.2018.03.002.

GHOSH, P., BHATTACHARJEE, A., BASU, A., SINGHA, S., BHATTACHARYA, S. Attenuation of cyclophosphamide-induced pulmonary toxicity in Swiss albino mice by naphthalimide-based organoselenium compound 2-(5-selenocyanatopentyl) - benzo[de]isoquinoline 1,3-dione. *Pharmaceutical Biology*. v. 53, p. 524-532, 2015. doi: 10.3109/13880209.2014.931440

GODOY, B. R. B., CONTE, A. M., GOVONI, B., BOEIRA, J. M. Evaluation of Micronuclei and Other Nuclear Alterations in Oral Mucosa Exfoliated Cells of Individuals Directly and Indirectly Exposed to Pesticides. *Brazilian Journal of Development*, v.5, p. 23889-23906, 2019. <https://doi.org/10.34117/bjdv5n11-086>

HABIG, W. H., PABST, M. J., JACOBY, W. B. Glutathione S-transferase, the first enzymatic step in mercapturic acid formation. *Journal of Biological Chemistry*, v. 249, p. 7130-7139, 1974. doi: 10.1016/S0021-9258(19)42083-8

- IGHODARO, O.M., AKINLOYE, O.A. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid. *Alexandria Journal of Medicine*, v. 54, p. 287-293, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ajme.2017.09.001>.
- KERN, J.C., KEHRER, J.P. Acrolein-induced cell death: A caspase-influenced decision between apoptosis and oncosis/necrosis. *Chemical Biological Interactions*, v. 139(1), p. 79-95, 2002. doi: 10.1016/s0009-2797(01)00295-2.
- KUSKOSKI, E.M.; ASUERO, G.A.; TRONCOSO, A.M.; MANCINI-FILHO, J.; FETT, R. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidante em pulpa de frutos. *Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v.25, n.4, p.726-732, 2005.
- LIU, F., LI, X. L., LIN, T., HE, D.W., WEI, G.H., LIU, J.H., LI, L.S. The cyclophosphamide metabolite, acrolein, induces cytoskeleton changes and oxidative stress in sertoli cells. *Molecular Biology Reports*, v. 39, p. 493-500, 2012. DOI: 10.1007/s11033-011-0763-9
- LUANGMONKONG, T.; SURIGUGA, S.; MUTSAERS, H. A.; GROOTHUIS, G. M.; OLINGA, P.; BOERSEMA, M.. Targeting oxidative stress for the treatment of liver fibrosis. *Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology*, Springer, v.175, p.71-102, 2018. [http://doi.org/10.1007/112\\_2018\\_10](http://doi.org/10.1007/112_2018_10)
- LUIZ, T. C.; CUNHA, A. P. S.; AGUIAR, D. ; SUGUI, M. M.; BICUDO, R. C.; SINHORIN, A. P.; SINHORIN, V. D. G. Antioxidant potential of *Carica papaya* Linn (Caricaceae) leaf extract in mice with cyclophosphamide induced oxidative stress. *Scientia Medica Porto Alegre*, v. 30, p. 1-15, 2020. DOI: 10.15448/1980-6108.2020.1.34702
- MacGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL C.; SALAMONE, M. F.; TIA, R. R.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, v.189, p.103-12, 1987. DOI: 10.1016/0165-1218(87)90016-4
- MALAVOLTA, E. Elementos de nutrição mineral de plantas. Piracicaba: Ceres, 251p, 1980.
- MANOHARAN, K., BANERJEE, M.R.  $\beta$ -Carotene reduces sister chromatid exchange induce chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. *Cell Biology International Reports*, v. 9, p.783-789.1985. doi: 10.1016/0309-1651(85)90096-7.
- MISRA, H. P., FRIDOVICH, I. The role of superoxide anion in the auto-oxidation of epinephrine and a simple assay for superoxide dismutase. *Journal of Biological Chemistry*, v. 247, p. 3170–3175, 1972. DOI: 10.1016/S0021-9258(19)45228-9
- NELSON, D.L., COX, M.M. Princípios de bioquímica de Lehninger, 5.ed., 2011. Porto Alegre. 1274p.
- NELSON, D. P., KIESOW, L. A. Enthalpy of decomposition of hydrogen peroxide by catalase at 25°C (with molar extinction coefficients of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> solution in the UV). *Analytical Biochemistry*; v. 49, p. 474–478, 1972. DOI: 10.1016/0003-2697(72)90451-4
- PEREIRA, A.L.F., ABREU, V.K.G., RODRIGUES, S. CUPUASSU - *Theobroma grandiflorum*, Exotic Fruits, Academic Press, p. 159-162, 2018, ISBN 9780128031384. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803138-4.00021-6>.
- PEREIRA, C.A.B. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética, In: RABELLO-GAY, M.N., RODRIGUES M.A, La R., Montelleone-Neto (Eds.) *Mutagenese, teratogenese e carcinogenese: métodos e critérios de avaliação*. São Paulo: FCA, p.113-21, 1991.
- PUGLIESE, A.G., TOMAS-BARBERAN, F.A., TRUCHADO, P., GENOVESE, M.I. Flavonoids, Proanthocyanidins, Vitamin C, and Antioxidant Activity of *Theobroma grandiflorum* (Cupuassu) Pulp and Seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 61(11), p. 2720–2728, 2013. doi: 10.1021/jf304349u.
- PUNARO, G.R., LIMA, D.Y., RODRIGUES, A.M., PUGLIERO, S., MOURO, M.G., ROGERO, M.M., HIGA, E.M.S. Cupuaçu extract reduces nitrosative stress and modulates inflammatory mediators in the kidneys of experimental diabetes. *Clinical Nutrition*, v. 38 (1), p. 364-371, 2019. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2017.12.016>.
- SEDLACK, J.; LINDSAY, R. H. Estimation of total, protein bound, and nonprotein sulphhydryl groups in tissue with Ellman's reagent. *Analytical Biochemistry*, v. 25, 192-205, 1968. DOI: 10.1016/0003-2697(68)90092-4
- SILVA, E.M., SOUZA, J.N.S., ROGEZ, H., REES, J.F., LARONDELLE, Y. Antioxidant activities and polyphenolic contents of fifteen selected plant species from the Amazonian region. *Food Chemistry*, v.101, n.3, p.1012-1018, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.055>
- SOUZA, A.G.C., ALVES, R.M., SOUZA, M.G. Cupuaçu, *Theobroma grandiflorum*. IICA, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 24 p, 2017.

SPADA, P.D.S., SOUZA, G.G.N., BORTOLINI, G.V., HENRIQUES, J.A.P., SALVADOR, M. Antioxidant, mutagenic, and antimutagenic activity of frozen fruits. *Journal of Medicinal Food*, v.11(1), p.144-151, 2008. doi: 10.1089/jmf.2007.598.

STANKIEWICZ, A., SKRZYDLEWSKA, E., MAKIELA, M. Effects of amifostine on liver oxidative stress caused by cyclophosphamide administration to rats. *Drug Metabolism and Drug Interactions*, v.19(2), p.67-82, 2002. doi: 10.1515/dmdi.2002.19.2.67.

VILLACHICA, H. Frutales y hortalizas promisorios de la Amazonia. Lima: Tratado de Cooperación Amazonia, p. 33-42, 1996.

VRIESMANN, L. C., PETKOWICZ, C.L.O. Polysaccharides from the pulp of cupuassu (*Theobroma grandiflorum*): Structural characterization of a pectic fraction, *Carbohydrate Polymers*, v. 77 (1), p. 72-79, 2009. ISSN 0144-8617. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.12.007>.

YAN, L. J., TRABER, M. G., PACKER, L. Spectrophotometric method for determination of carbonyls in oxidatively modified apolipoprotein B of human lowdensity lipoproteins. *Analytical Biochemistry*, v. 228, p. 349– 351, 1995. doi: 10.1006/abio.1995.1362

YANG, H., PROTIVA, P., CUI, B., MA, C., BAGGETT, S., HEQUET, V., MORI, S., WEINSTEIN, B.E., KENNELLY, E.J. New Bioactive Polyphenols from *Theobroma grandiflorum* (“Cupuaçu”). *Journal of Natural Products*, v. 66, p. 1501-1504, 2003. <https://doi.org/10.1021/np034002j>