



JULIANA PINTO DE LIMA

**PRIMEIRA AVALIAÇÃO DO EFEITO
ANTIMUTAGÊNICO *IN VIVO* DA MANGABA E
IDENTIFICAÇÃO DO SEU PERFIL FENÓLICO**

LAVRAS – MG

2015

JULIANA PINTO DE LIMA

**PRIMEIRA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMUTAGÊNICO *IN VIVO*
DA MANGABA E IDENTIFICAÇÃO DO SEU PERFIL FENÓLICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

Orientador

Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas

LAVRAS – MG

2015

**Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha
Catalográfica da Biblioteca Universitária da UFLA, com dados
informados pelo (a) próprio(a) autor(a).**

Lima, Juliana Pinto de.

Primeira avaliação do efeito antimutagênico *in vivo* da mangaba e
identificação do seu perfil fenólico / Juliana Pinto de Lima. – Lavras:
UFLA, 2015.

93 p.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Lavras, 2015.

Orientador: Eduardo Valério de Barros Vilas Boas.

Bibliografia.

1. Antimutagenicidade. 2. Doxorrubicina. 3. Compostos fenólicos. I.
Universidade Federal de Lavras. II. Título.

JULIANA PINTO DE LIMA

**PRIMEIRA AVALIAÇÃO DO EFEITO ANTIMUTAGÊNICO *IN VIVO*
DA MANGABA E IDENTIFICAÇÃO DO SEU PERFIL FENÓLICO**

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutor.

APROVADA em 19 de junho de 2015.

Dr. Elisângela Elena Nunes Carvalho	UFLA
Dr. Maria de Fátima Piccolo Barcelos	UFLA
Dr. Luciana Azevedo	UNIFAL
Dr. Camila Argenta Fante	UFMG

Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas
Orientador

LAVRAS – MG

2015

AGRADECIMENTOS

Início os agradecimentos a Deus, por ter me protegido e me guiado durante todos os momentos, por me dar a força e a segurança necessárias quando o caminho se apresentava mais tortuoso do que se imaginava.

Aos meus pais, Áurea Lúcia Pinto de Lima e José João da Costa Lima e aos meus irmãos, agradeço pelo apoio incondicional e o respeito que tiveram pelo meu trabalho, por compreenderem a importância deste desafio e me estimularem a seguir em frente. Aos meus pais também agradeço por terem me apresentado e ensinado a importância do Cerrado, em especial a mangaba, que foi fonte de inspiração durante esta etapa.

Ao meu namorado, Bruno Geraldo Alves, por estar todo o tempo ao meu lado, mesmo nas situações mais difíceis que se apresentavam, por compreender a ausência em tantos momentos, por caminhar comigo esta caminhada, me ajudando a ajustar o passo, para que, no fim, tudo valesse a pena.

Ao professor Dr. Eduardo Valério de Barros Vilas Boas, meu orientador, pelo acolhimento, confiança, atenção, paciência, ensinamentos e disponibilidade concedidos durante todos esses anos. Obrigada, professor, por tudo e espero que nossa parceria se estenda para além do doutorado.

À professora Dra. Luciana Azevedo, minha coorientadora, pela disponibilidade de uso do Laboratório de Análise Nutricional e Toxicológica *in vivo* (LANTin) e, principalmente, pela atenção, empenho e dedicação em me ajudar durante todos os momentos.

À professora Dra. Elisângela Elena Nunes, pelo apoio fundamental nas análises químicas do meu trabalho e por acreditar em meu potencial e encorajar a minha caminhada. Extrapolando o meio acadêmico, agradeço também por você ter sido esta amiga tão paciente e acolhedora!

Às professoras Dra. Maria de Fátima Pícolo Barcelos e Dra. Camila Argenta Fante, por prontamente aceitarem o convite de participação na banca examinadora do doutorado e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

Aos meus amigos para toda hora e para toda vida, que sempre torceram pelo sucesso da minha caminhada, em especial às minhas sempre amigas: Christiane de Fátima Fernandes Lucena, Ana Paula Miranda e Miriam Souza.

Aos amigos e companheiros do Laboratório de Pós-Colheita de Frutas e Hortaliças (Paulo, Ana Clara, Aline, Heloísa, Ana Beatriz e Mariana) e do LANTin (Débora, Rafaela, Luana, Lellis, Jéssica, Aline, João Paulo, Marcela, Leonardo e Dayse), pelo apoio, convivência e auxílio na superação dos desafios e lutas que travamos juntos. Em especial, minhas amigas Caroline Roberta Freitas Pires e Nádia Janaina de Souza, por serem parte fundamental deste trabalho.

À minha amiga Flávia Della Lúcia e, é claro, a Bia, pelas rezas e palavras que sempre se repetiam e estimulavam: “Tudo vai dar certo!”, meu caloroso agradecimento pela acolhida em sua casa durante meses de construção deste trabalho.

À Universidade Federal de Lavras, em especial aos Departamentos de Ciência dos Alimentos e Ciência dos Solos; à Faculdade de Nutrição de Alfenas (FANUT) e ao Instituto Federal do Sudeste de Minas Gerais – Barbacena, pela oportunidade concedida e apoio durante o doutorado. Ressalto aqui a importância das amigas e professoras Thais Oliveira, Rejjane Bastos e Márcia Carvalho que sempre me apoiaram.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Pesquisa Científica (CNPq) e à Fundação de Apoio à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento das ações deste projeto e pela bolsa concedida durante parte do doutorado.

*Porque se chamava moço
Também se chamava estrada
Viagem de ventania
Nem lembra se olhou pra trás
Ao primeiro passo, aço, aço, aço...*

*Porque se chamava homem
Também se chamavam sonhos
E sonhos não envelhecem
Em meio a tantos gases lacrimogênicos
Ficam calmos, calmos, calmos...*

*E lá se vai mais um dia
E basta contar compasso
e basta contar consigo
Que a chama não tem pavio
De tudo se faz canção
E o coração
Na curva de um rio...*

Clube da Esquina II - Fernando Venturim & Milton Nascimento

RESUMO GERAL

A mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), fruto nativo do Cerrado, apresenta grande potencial de exploração devido às características sensoriais atrativas, elevado valor nutricional e presença de substâncias bioativas. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar a composição química da polpa de mangaba, além de verificar seu efeito protetor/indutor de mutagenicidade *in vivo*. Para tanto, a pesquisa foi constituída de duas partes. Na primeira etapa foi realizada a caracterização química (composição centesimal, acidez titulável, pH, sólidos solúveis, minerais, atividade antioxidante, ácido ascórbico, carotenoides, compostos fenólicos totais e perfil de fenólicos) e na segunda, foram avaliados os efeitos mutagênicos/antimutagênicos da polpa de mangaba, por meio do teste de micronúcleos de medula óssea e cólon, apoptose, estresse oxidativo e teste do cometa. Para a realização do experimento *in vivo* seguiram-se os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) certificado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Unifal-MG (protocolo nº417/2012). Foram utilizados 80 camundongos *Swiss* de 4 a 5 semanas (25 ± 5 g peso corporal), os quais foram alimentados *ad libitum* com uma dieta comercial e água, permaneceram sob condições controladas, com temperatura de $22\pm 3^\circ$ C; umidade relativa do ar de $50\pm 20\%$ e um ciclo de luz 12 horas claro/12 horas escuro, durante o período de 14 dias. Os animais foram divididos em dez grupos contendo 8 animais cada. A polpa de mangaba foi administrada em três doses, 10, 20 e 40 ml/kg de peso corporal, por gavagem, duas vezes ao dia. Ao final do tempo experimental, os animais receberam doxorrubicina (DXR) ou dimetil-hidrazina (DMH), drogas indutoras da mutagenicidade, ou solução salina fisiológica e, no 15º dia, os animais foram anestesiados (ketamina e xilazina) e, em seguida, submetidos à eutanásia. Para a realização das análises, durante a necropsia, as células de medula óssea, o fígado e o sangue periférico foram coletados a partir dos animais que receberam DXR, e o fígado e o cólon foram removidos dos animais que receberam DMH. Como principais resultados, pode-se destacar que, na polpa de mangaba, foram identificados sete compostos fenólicos: ácido gálico, catequina, ácido clorogênico, ácido vanílico, *o*-cumárico, ácido rosmarínico e rutina. Os testes *in vivo* revelaram que a polpa de mangaba não mostrou efeitos tóxicos/mutagênicos em qualquer um dos ensaios realizados, apresentando efeitos protetores. Nas três concentrações de mangaba administradas, os principais resultados sobre os efeitos protetores foram os seguintes: teste do micronúcleo de medula óssea (42,33%, 58,14% e 77,21%), teste de micronúcleo de cólon (34,21%, 63,15% e 78,07%) e índice de apoptose (57,5%, 43,68% e 65,52%).

Conclui-se que este estudo fornece a evidência científica para o potencial antimutagênico da polpa de mangaba e reforça a possibilidade de ser empregada como um alimento funcional, com aplicabilidade na indústria de alimentos.

Palavras-chave: *Hancornia speciosa* Gomes. Antimutagenicidade. Doxorrubicina. Dimetilhidrazina teste do micronúcleo. Compostos fenólicos.

GENERAL ABSTRACT

Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes), fruit native to the Cerrado (tropical savanna ecoregion), presents a great exploitation potential due to its attractive sensorial characteristics, high nutritional value and presence of bioactive substances. This work was carried out with the purpose of evaluating the chemical composition of the mangaba pulp, in addition to verifying its protecting\ *in vivo* mutagenicity-inducing effect. For this purpose, the study was constituted of two parts, in the first step, the chemical characterization (centesimal composition, titrable acidity, pH, soluble solids, minerals, antioxidant activity, ascorbic acid, carotenoids, total phenolic compounds and phenolic profile) was conducted and in the second step, the mutagenic\antimutagenic of the mangaba pulp were evaluated through the micronucleus test of bone marrow and colon, apoptosis, oxidative stress and comet assay. For the doing of the *in vivo* experiment, the Ethic Principles in the Animal Experimentation adopted by the Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) (Brazilian College of Animal Experimentation) certified by the Ethics Committee in the Use of Animals of Unifal-MG (protocol number 417/2012). 80 Swiss mice aged 4 to 5 weeks (25 ± 5 g body weight) were used, these were fed *ad libitum* a commercial diet and water, remained under controlled conditions with temperature of 22° C ($\pm 3^{\circ}$ C); relative humidity of air of 50% ($\pm 20\%$) and a light cycle of 12h light /12h dark, during the period of 14 days. The animals were divided into ten groups, containing 8 animals in each. The mangaba pulp was given at three doses, 10, 20 and 40 ml/kg of body weight, by gavage of the experimental time a day. At the end of the experimental time, the animals were given doxorubicin (DXR) or dimethylhydrazine (DMH), mutagenicity-inducing drugs or physiologic salt solution and on the 15th days, the animals were anesthetized (ketamine and xylazine) and next, submitted to euthanasia. For the conduction of the analyses, during the necropsy, the cells of the bone marrow cells, livers and peripheral blood were collected from the animals which received DXR and the livers and colons were removed from the animals which were given DMH. As main results, one can stand out that in the mangaba pulp, seven phenolic compounds were identified: galic acid, catechin, chlorogenic acid, vanilic acid, *o*-coumaric acid, rosmarinic acid and rutin. The *in vivo* tests revealed that the mangaba pulp did not show toxic/mutagenic effects in any of the assays conducted, presenting protecting effects. In the three concentrations of mangaba administered, the main results on the protecting effects were the following: micronucleus test of bone marrow (42.33, 58.14 and 77.21%), micronucleus test of colon (34.21, 63.15 and 78.07%), apoptosis index (57.5, 43.68 and 65.52%). It follows that this study

provides scientific evidence to the antimutagenic potential of the mangaba pulp and reinforces its potential as a functional food with applicability in the food industry.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes. Antimutagenicity. Doxorubicin. Dimethylhydrazine. Micronucleus test. Phenolic compounds.

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	12
1	INTRODUÇÃO GERAL	12
2	REFERENCIAL TEÓRICO	14
	REFERÊNCIAS	44
	SEGUNDA PARTE	58
	ARTIGO 1 First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit <i>in vivo</i> and its phenolic profile identification	58

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO GERAL

Os novos hábitos alimentares, bem como o novo estilo de vida, expõem o homem a uma gama de fatores de risco para as doenças crônicas não transmissíveis (DCNT). Entre esses fatores de risco destaca-se o consumo de dietas desequilibradas, além de vida estressante e sedentária, tabagismo, alcoolismo e uso de contraceptivos. Isso leva a mudanças no perfil epidemiológico dos países, em que se observa número crescente de doenças, como obesidade, diabetes, hipertensão, doenças cardiovasculares, osteoporose e vários tipos de cânceres.

Nos últimos anos, em grande número de estudos há relatos de que a dieta é um fator extremamente importante, em termos de indução ou prevenção de doenças. Já é estabelecido que algumas substâncias bioativas, como compostos fenólicos, ácido ascórbico, minerais e carotenoides, dentre outros, podem desempenhar papel importante na modulação ou na prevenção do desenvolvimento do cancro. Nesse contexto, a ênfase na busca por alimentos que contribuem para a obtenção de saúde adequada tem crescido significativamente em todo o mundo. Em face disso, o consumo de vegetais tem aumentado, dadas as propriedades benéficas que estes apresentam.

O Brasil apresenta incontáveis frutíferas nativas com potencial a ser explorado, dentre as quais se destaca a mangabeira, *Hancornia speciosa* Gomes, árvore que dá origem a mangaba. A mangaba apresenta-se como uma baga elipsoide ou esférica, de cor amarela ou esverdeada, com ou sem pigmentação vermelha, polpa branca, succulenta, adocicada, muito aromática e com potencial para ser empregada na elaboração de produtos.

Algumas partes da mangabeira apresentam aplicação na medicina popular, como a casca, as folhas e o látex obtido a partir do tronco. Na literatura científica, o que se verifica são estudos acerca das partes da mangabeira, sendo rara a avaliação do potencial do fruto. Assim, as avaliações da composição química, com atenção aos compostos bioativos e às atividades funcionais e toxicológicas que a mangaba pode apresentar, ainda são escassas.

Dessa forma, reforça-se a necessidade contínua de novos estudos para, cada vez mais, conhecer as potencialidades deste fruto. Sendo assim, para compreender os efeitos *in vivo* da *H. speciosa*, foi desenvolvida esta tese, que se divide em dois capítulos. No primeiro capítulo trata-se da revisão de literatura, fazendo considerações gerais sobre o bioma Cerrado, dando enfoque à cultura da mangaba e realizando-se uma descrição das suas principais características, incluindo aspectos físicos, químicos, nutricionais, perfil antioxidante, substâncias bioativas e atividades biológicas da espécie. Ao final, faz-se uma apresentação sobre câncer e drogas indutoras em estudos *in vivo*. Já no segundo capítulo avalia-se a composição química da polpa de mangaba, além de verificar seu efeito protetor/indutor de mutagenicidade *in vivo*.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 O Cerrado brasileiro

No Brasil verifica-se a ocorrência de seis grandes biomas: o Cerrado, os Campos Sulinos, as Florestas Atlântica e de Araucária, a Caatinga, a Floresta Amazônica e o Pantanal. A localização geográfica destes biomas é condicionada, predominantemente, pelos fatores climáticos, como a temperatura, a pluviosidade e a umidade relativa, e, em menor escala, pelo tipo de substrato (RIBEIRO; WALTER, 1998).

De acordo com Roque (2006), o Cerrado é a segunda maior formação vegetal brasileira, cobrindo cerca de 25% do território nacional, ou seja, aproximadamente 204 milhões de hectares. Minas Gerais, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Tocantins e Goiás, incluindo o Distrito Federal, são os estados que apresentam as maiores áreas contínuas de Cerrado. Trata-se do bioma de Savana mais rico de biodiversidade do mundo, contendo um terço de toda a biodiversidade existente no Brasil, com uma enorme riqueza de espécies vegetais, além de nascentes de grandes bacias hidrográficas (SANO et al., 2008). O Cerrado tem mais de 10 mil espécies de plantas, sendo 44% endêmicas, isto é, que ocorrem apenas na região (ROQUE, 2006).

O Cerrado encontra-se em terrenos de altitude superior a 700 m, com aparência e características bem definidas. O clima da região é bastante regular, com médias anuais entre 21 e 27°C, podendo apresentar variações diárias de mais de 15 °C. Tem duas estações bem definidas: a chuvosa, que vai de outubro a abril, concentrando quase que 90% das precipitações atmosféricas e média anual de chuvas em torno de 1.200 mm a 1,800 mm; já a estação seca ocorre nos meses de maio a setembro, que coincide com o inverno, quando a temperatura média pode ficar abaixo dos 20 °C e os índices pluviométricos mensais ficam

muito reduzidos, podendo cair a zero (ROQUE, 2006). Os latossolos predominam no Cerrado Brasileiro, estando presentes em 46% da área do bioma. Estes tipos de solo se caracterizam, principalmente, pela baixa fertilidade e alta acidez. Por outro lado, trata-se de solos antigos, profundos, com ótima drenagem e que se assentam em relevos planos ou levemente ondulados (SANTOS et al., 2010).

Cerrado é uma palavra de origem espanhola que significa fechado (RIBEIRO; WALTER, 1998) e busca traduzir a característica geral da vegetação arbustivo-herbácea densa que ocorre nesse tipo de formação. Em razão das características climáticas, a vegetação típica do Cerrado desenvolveu vários mecanismos de adaptação e sobrevivência (ROQUE, 2006). Troncos tortuosos, cobertos por uma cortiça grossa, cujas folhas são geralmente grandes e rígidas, características atribuídas por Ferri (1977), à vegetação que vive em ambiente onde a água é escassa (xeromorfismo).

Embora o cerrado seja um bioma altamente diverso em paisagens e espécies da flora e da fauna, ainda há carência de estudos voltados para a identificação de espécies com potencial econômico, a elaboração de planos de manejos para espécies exploradas e a caracterização da dinâmica do extrativismo vegetal (PARRON et al., 2008).

As frutíferas nativas do Cerrado constituem fontes em potencial de exploração econômica, pois apresentam características peculiares, com formas variadas, cores atrativas e sabores característicos (MARTINS, 2006). Dentre as espécies com potencial econômico destaca-se a *Hancornia speciosa* Gomes, popularmente conhecida como mangabeira, planta que dá origem à mangaba.

2.2 Mangaba

A mangabeira pertence à classe *Dicotyledoneae*, ordem *Gentianales*, família *Apocynaceae*, gênero *Hancornia* e espécie *Hancornia speciosa*. No gênero *Hancornia* a espécie mais importante é a *Hancornia speciosa*, descrita por Gomes em 1812 (LEDERMAN et al., 2000).

A mangabeira é uma árvore perene, com porte variando entre 4 m e 7 m de altura, podendo chegar até 15 m, de crescimento lento e copa ampla. A raiz é pivotante profunda e toda a planta exsuda látex de cor branca ou róseo-pálida. Tem folha simples, oposta, oval ou lanceolada, peciolada, glabra ou não, de consistência coriácea. Suas flores são hipocrateriformes, com um tubo floral relativamente longo e estreito, de coloração branca, campanuladas e aromáticas. Em ramos novos do ano existe inflorescência em dicásio terminal, com dois a quatro ou até cinco flores hermafroditas (GANGA; CHAVES; NAVES, 2009). Apresenta, normalmente, na região dos Cerrados, floração durante o período de agosto a novembro, com pico em outubro (SANTOS et al., 2007). Já a colheita dos frutos é iniciada, normalmente, em novembro ou em dezembro e se estende até os meses de maio ou junho, em algumas regiões (CARNELOSSI et al., 2004). A mangabeira começa a sua produção entre o terceiro e o quinto ano após o plantio e, 50 anos mais tarde, continua a fornecer 10 a 12 t /ha (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011; SILVA JÚNIOR, 2004).

A palavra mangaba é de origem tupi-guarani e significa “coisa boa de comer” (EPSTEIN, 2004; SILVA JÚNIOR, 2004). Algumas variantes do nome mangaba são também utilizadas no Brasil, como mangaíba, mangareíba, mangava, mangaúva e manguba.

De acordo com Barros et al. (2006), Ganga, Chaves e Naves (2009) e Sousa et al. (2005), os frutos da mangabeira apresentam-se como baga elipsoide ou esférica, coloração amarela ou esverdeada com ou sem pigmentação

avermelhada, que contém polpa branca, macia, fibrosa e adocicada, que recobre um número variável de sementes recalcitrantes, achatadas e discoides, com coloração castanho-clara. Em estágio de maturação, o fruto tem casca amarelada ou esverdeada, com ou sem pigmentação avermelhada, sendo bastante aromático e perecível. Em média, é constituído de polpa (77%), casca (11%) e semente (12%). No entanto, apenas a polpa assume posição de destaque no aspecto comercial.

A mangaba é uma das frutas prediletas do cerrado e apresenta apreciáveis aroma e sabor, sendo consumida ao natural ou também utilizada pela indústria de alimentos, na produção de doces, geleia, xarope, compotas, vinho, vinagre, suco e sorvete (CLERICI; CARVALHO-SILVA, 2011). Sua utilização agroindustrial está sendo rapidamente difundida devido à grande aceitação. Acrescente-se, ainda, o fato de que este fruto apresenta alto rendimento de polpa, em torno de 94%, o que o torna interessante para utilização pela indústria (VIEIRA NETO et al., 2002).

Silva et al. (2009), avaliando a composição da mangaba, encontraram valores de 82,4% de umidade, 1,2% para proteína, 2,37% de lipídios, 10,02% para carboidratos, 3,4% de fibra alimentar e 0,58% de resíduo mineral fixo. Apresentaram também valores da ordem de 35 mg.100 g⁻¹ de cálcio, 0,78 mg.100 g⁻¹ de zinco e 0,88 mg.100g⁻¹ de ferro.

Almeida et al. (2009), ao avaliarem os macrominerais presentes na mangaba, encontraram valores (em mg.100 g⁻¹) de 33,78 de sódio, 240,42 de potássio, 8,52 de cálcio, 70,27 de magnésio e 6,05 de fósforo, apresentando altos valores de magnésio e sódio, comparados com as demais frutas. A mangaba pode ser considerada excelente fonte de magnésio, pelo fato de, em 100 g da fruta, serem encontrados 20% da necessidade média estimada (EAR) de magnésio/dia por um adulto. Os mesmos autores, ao avaliarem microminerais

(mg.100g⁻¹), obtiveram 0,95 para ferro, 0,08 para cobre, 0,12 para zinco e 0,80 para selênio.

O valor energético, em cada 100 g de fruta, é de cerca de 40 calorias. Altos teores de sólidos solúveis associados à considerável acidez, além do paladar exótico, conferem à mangaba um sabor muito apreciado pelos consumidores (SOARES et al., 2006).

Barros (2008) isolou compostos de classes estruturais distintas, resultantes do fracionamento químico dos extratos hexânico e etanólico das folhas de *H. speciosa*. Do extrato hexânico foram obtidos mistura de hidrocarbonetos, álcoois de cadeia longa, triterpenos, α e β -amirina, lupeol, obtusalina, eritrodiool, β -sitosterol e mistura de ésteres. Já do extrato etanólico foi verificada mistura de rutina e ácido clorogênico.

2.3 Atividade antioxidante

Os radicais livres podem ser definidos como moléculas ou fragmentos moleculares contendo um ou mais elétrons desemparelhados. Esta configuração faz dos radicais livres moléculas altamente instáveis e confere-lhes um considerável grau de reatividade (VALKO et al., 2004). Os radicais livres são formados por meio de uma variedade de eventos e caminhos, podendo ser gerados no citoplasma, nas mitocôndrias ou na membrana plasmática, e o seu alvo celular (proteínas, lipídeos, carboidratos e DNA) está relacionado com o seu sítio de formação (ANDERSON, 1996; BIANCHI; ANTUNES, 1999; POMPELLA, 1997; YU; ANDERSON, 1997). Dentre os radicais livres estão incluídas espécies de oxigênio como oxigênio singlete (¹O₂), o ácido hipocloroso (HOCL), o hidropéroxido (HO₂•), o superóxido (O₂•), a hidroxila (OH•), o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e as espécies de nitrogênio, como óxido nítrico

(NO•) e dióxido de nitrogênio (NO₂•) (ABREU, 2010; BORGUINI, 2006; SHAMI; MOREIRA, 2004).

Após a sua formação, os radicais livres reagem rapidamente com compostos celulares, iniciando reações em cascata. Em condições normais, o sistema de defesa antioxidante enzimático, constituído por glutatona peroxidase, superóxido-dismutase e catalase, juntamente com o sistema não enzimático (ácido ascórbico, vitamina E, carotenoides e flavonoides, dentre outros), controla os efeitos deletérios dos radicais livres. No entanto, se houver produção excessiva de radicais livres, superando a capacidade de defesa do sistema antioxidante, eleva-se o risco do surgimento de doenças crônicas não transmissíveis com danos profundos aos tecidos, sendo este desequilíbrio chamado de estresse oxidativo, que pode culminar com a oxidação lipídica (ABREU, 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; SHAMI; MOREIRA, 2004).

A oxidação lipídica de ácidos graxos insaturados nas membranas lipídicas é um processo conhecido como peroxidação lipídica. Esse processo promove grave alteração da membrana celular, causando perda da fluidez, alteração da função secretora e perda da seletividade, com liberação do conteúdo de organelas, levando à formação de produtos citotóxicos até a morte celular (PIENIZ et al., 2009). Segundo Valko et al. (2006), o processo global da peroxidação lipídica é constituído por três etapas: iniciação, propagação e terminação. Durante este processo ocorre a formação de radicais peroxila (ROO•) e o produto final do processo de peroxidação é o chamado malondialdeído (MDA). Sendo assim, uma das formas de se avaliar o estresse oxidativo celular é por meio da avaliação de marcadores, tais como o malonaldeído, o qual é o produto final da degradação não enzimática de ácidos graxos. Com isso, altos níveis de MDA indicam um aumento da peroxidação (KASHYAP et al., 2005).

A peroxidação lipídica pode ser inibida por antioxidantes que interrompem a cadeia de peroxidação reagindo com os radicais peroxila ou

alcoxila e, dessa forma, gerando um hidroperóxido e um radical livre formado a partir do antioxidante (KOLEVA et al., 2002; MAFRA; ABDALLA; COZZOLINO, 1999).

O termo antioxidante tem natureza multiconceitual. No entanto, de maneira geral, antioxidante pode ser definido como uma família heterogênea de moléculas naturais que, presentes em baixas concentrações, comparativamente às biomoléculas que supostamente protegeriam, podem prevenir ou reduzir a extensão do dano oxidativo (OLIVEIRA et al., 2009).

Notadamente, compostos antioxidantes estão presentes naturalmente em frutas e algumas apresentam altas concentrações de determinados grupos (DUARTE-ALMEIDA et al., 2006). Assim, várias pesquisas têm surgido no intuito de conhecer a atividade antioxidante que se apresenta nos produtos vegetais.

Diversas técnicas têm sido utilizadas para determinar a atividade antioxidante, de forma a permitir uma rápida seleção de substâncias e/ou misturas potencialmente interessante, não havendo, portanto, um método que seja universal para todos os extratos de plantas e alimentos (ABREU, 2010; DUARTE-ALMEIDA et al., 2006; NIKI, 2002). Com base neste pressuposto, pode-se destacar, entre os métodos presentes na literatura para a detecção da capacidade antioxidante de um alimento, o método de sequestro de radicais livres 2,2-difenil-1-picril-hidrazila (DPPH^{*}).

O método de sequestro de radicais livres está baseado no descolorimento de uma solução composta por radicais estáveis DPPH^{*} de cor violeta, quando da adição de substâncias que podem ceder um átomo de hidrogênio. Assim, o método de sequestro de radicais livres por DPPH^{*} baseia-se na transferência de elétrons de um composto antioxidante para um oxidante (BRAND-WILLIAMS; CUVELIER; BERSET, 1995; HUANG; OU; PRIOR, 2005). Dessa forma, o

grau de descoloramento da solução indica a eficiência de captura do radical pelo antioxidante presente na amostra (ABREU, 2010; QUEIROZ, 2006).

Alguns autores demonstraram alta atividade antioxidante da mangaba, maior do que muitas frutas analisadas, como cajá, caju, umbu e açaí (RUFINO et al., 2010), além de abacaxi, graviola, pinha, jaca, mamão, sapoti, ciruela, umbu e tamarindo (ALMEIDA et al., 2011).

A atividade antioxidante de um alimento é resultado da ação de cada um de seus componentes antioxidantes. Além disso, os componentes antioxidantes de um alimento podem interagir entre si e produzir efeitos sinérgicos ou inibitórios (ABREU, 2010; KUSKOSKI et al., 2005). Assim, a atividade antioxidante total de um alimento pode ser maior ou menor que a soma da atividade antioxidante de cada composto avaliado separadamente (ABREU, 2010; BORGUINI, 2006).

Dentre os principais antioxidantes naturais encontrados em frutos e em hortaliças destacam-se os carotenoides, o ácido ascórbico e os compostos fenólicos que serão descritos a seguir.

2.3.1 Carotenoides

Os carotenoides representam uma classe de antioxidantes naturais, muitos com ação pró-vitáminica A, encontrados em frutas e vegetais, sendo estes pigmentos sintetizados por plantas e microrganismos. Existem mais de 600 carotenoides que ocorrem na natureza e são classificados em carotenos ou xantofilas. Os carotenos são hidrocarbonetos poliênicos com variados graus de insaturação e as xantofilas são sintetizadas a partir dos carotenos, por meio de reações de hidroxilação e epoxidação. O β -caroteno e o licopeno são exemplos de carotenos, enquanto a luteína e a zeaxantina são xantofilas (AMBRÓSIO; CAMPOS; FARO, 2006). Vários estudos têm indicado que os carotenoides

podem prevenir ou inibir certos tipos de cancro, arteriosclerose e degeneração muscular relacionada com a idade, dentre outras doenças (VALKO et al., 2006).

A atividade antioxidante dos carotenoides fundamenta-se, basicamente, na estrutura destes compostos, principalmente por possuírem um sistema de duplas ligações conjugadas, que favorece o deslocamento do elétron não pareado, e também pela presença de grupos substituintes no carotenoide (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007; RIOS; ANTUNES; BIANCHI, 2009), características estas que tornam possível o combate às espécies reativas de oxigênio.

Geralmente, três mecanismos diferentes são propostos para a eficiência dos carotenoides contra os radicais livres (VALKO et al., 2006; YOUNG; LOWE, 2001): transferência de elétrons ($CAR + ROO^{\bullet} \rightarrow CAR^{\bullet+} + ROO^{-}$), remoção de íons de hidrogênio ($CAR + ROO^{\bullet} \rightarrow CAR^{\bullet} + ROOH$) ou adição de espécies radicalares ($CAR + ROO^{\bullet} \rightarrow ROO^{\bullet}CAR^{\bullet}$). Ao agirem sobre os radicais livres, os carotenoides podem também se tornar uma espécie radicalar, sendo estes, normalmente, estabilizados por ressonância e, portanto, tornam-se pouco reativos. Eles podem decair por meio de reações com outros radicais, formando produtos estáveis (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

Rufino et al. (2010), ao avaliarem o teor de carotenoides totais em mangaba, encontraram valores na ordem de $0,3 \text{ mg} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ de matéria fresca. Cardoso et al. (2014), ao realizarem o perfil de carotenoides da mangaba oriunda do cerrado mineiro, encontraram a presença de β -caroteno e β -criptoxantina, com prevalência do β -caroteno (52,6%). Criptoxantina e β -caroteno são carotenoides que apresentam atividade pró-vitamina A, ou seja, são convertidos endogenamente a retinoides (CERQUEIRA; MEDEIROS; AUGUSTO, 2007).

2.3.2 Ácido ascórbico

O ácido ascórbico, ou vitamina C, é uma substância hidrossolúvel encontrada em diversas frutas e hortaliças. Quase a totalidade da necessidade de vitamina C do homem é satisfeita pelo consumo de frutos e hortaliças. A vitamina C encontra-se na natureza sob duas formas: reduzida ou oxidada (ácido deidroascórbico). Ambas são biologicamente ativas e a transformação reversível do ácido ascórbico em ácido deidroascórbico ocorre normalmente no interior das células (ABREU, 2010; BORGUINI, 2006).

Esta substância exerce diversas funções no organismo humano. Dentre elas, participa da hidroxilação da prolina e da lisina, necessárias para a biossíntese de colágeno, atua na síntese de carnitina e noraepinefrina, aumenta a absorção do ferro não heme mantendo o ferro no estado ferroso, atua na conversão do colesterol em ácidos biliares, participa dos processos celulares de oxirredução (ABREU, 2010; COZZOLINO, 2007; DAS et al., 2006; FANTINI et al., 2008; MAIA et al., 2007), é importante na biossíntese das catecolaminas, previne o escorbuto e atua na defesa do organismo contra infecções, sendo fundamental na integridade das paredes dos vasos sanguíneos (MANELA-AZULAY et al., 2003).

Várias linhas de evidência sugerem que a vitamina C é um poderoso antioxidante em frutas e vegetais. Além disso, ela coopera com a vitamina E para a sua regeneração. Alta ingestão de ácido ascórbico na dieta tem sido repetidamente associada a um menor risco de desenvolver câncer (LEONG; SHUI, 2002).

Na mangaba, a quantificação de vitamina C merece destaque. Conforme demonstram algumas pesquisas, a concentração de vitamina C varia numa faixa bem elevada. Rufino et al. (2009) verificaram teor de 431 mg.100 g⁻¹ na polpa da mangaba. Rufino et al. (2010) observaram teores de vitamina C de cerca de 190

mg.100 g⁻¹. Já Carnelossi et al. (2004), comparando os teores de vitamina C da mangaba com os de outros frutos, tais como morango, goiaba e abacaxi, verificaram que a mangaba é um fruto com teor elevado de vitamina C, ou seja, aproximadamente 252,7 mg.100 g⁻¹ matéria fresca.

Ramful et al. (2011) classificam os frutos em três categorias, de acordo com o teor de ácido ascórbico, que são baixo (<30 mg/100 g), médio (30-50 mg/100 g) e alto (> 50 mg/100 g). De acordo com esta classificação, a mangaba pode ser considerada como tendo alto teor de ácido ascórbico, tomando como base os resultados apresentados.

Almeida et al. (2011), quantificando ácido ascórbico de diferentes espécies nativas do Brasil, ciriguela, jaca, mangaba, murici, mamão, ananás, sapoti, graviola, pinha, tamarindo e umbu, encontraram o maior teor de ácido ascórbico na mangaba que todos os demais frutos avaliados (96,3 mg ácido ascórbico/100 g).

2.3.3 Compostos fenólicos

Os compostos fenólicos são quimicamente definidos como substâncias que têm pelo menos um anel aromático com um ou mais substituintes hidroxílicos, incluídos seus grupos funcionais. São originados do metabolismo secundário das plantas, sendo essenciais para o seu crescimento e reprodução. Além disso, se formam em condições de estresse, como infecções, fermentos e radiações UV, dentre outros. Em alimentos, são responsáveis pela cor, adstringência e aroma, dentre outras funções (ANGELO; JORGE, 2007; BECKMAN, 2000; NACZK; SHAHIDI, 2006).

A biossíntese dos compostos fenólicos é realizada por meio de duas rotas básicas: a rota do ácido chiquímico e a rota do ácido mevalônico, sendo a última de maior relevância no metabolismo de microrganismos e pouca

significância no metabolismo de vegetais. Destacando-se a via de maior importância, a rota do ácido chiquímico converte intermediários da glicólise (ácido fosfoenolpiruvato) e da via das pentoses fosfato (eritrose-4-fosfato) em aminoácidos aromáticos, cujo principal representante é a fenilalanina. Esta via apresenta a enzima fenilalanina amônia liase como reguladora do processo e dela origina-se a maioria dos fenóis (TAIZ; ZEIGER, 2004) (Figura 1).

Ainda pensando na rota biossintética, os ácidos fenólicos naturais, sejam eles oriundos do ácido benzoico ou do ácido cinâmico, têm a sua origem derivada exclusivamente da rota do ácido chiquímico. Já o esqueleto básico dos flavonoides, dois anéis aromáticos conectados por uma ponte de três átomos de carbono (C6-C3-C6), resulta de rotas biossintéticas separadas: a via do ácido chiquímico e a via do ácido malônico. A via do ácido chiquímico origina a fenilalanina, precursor do ácido cinâmico, sendo este responsável pelo anel aromático B e a ponte de três carbonos. O outro anel aromático, anel A do esqueleto básico dos flavonoides, é formado pela rota do acetato (LIANDA, 2009).

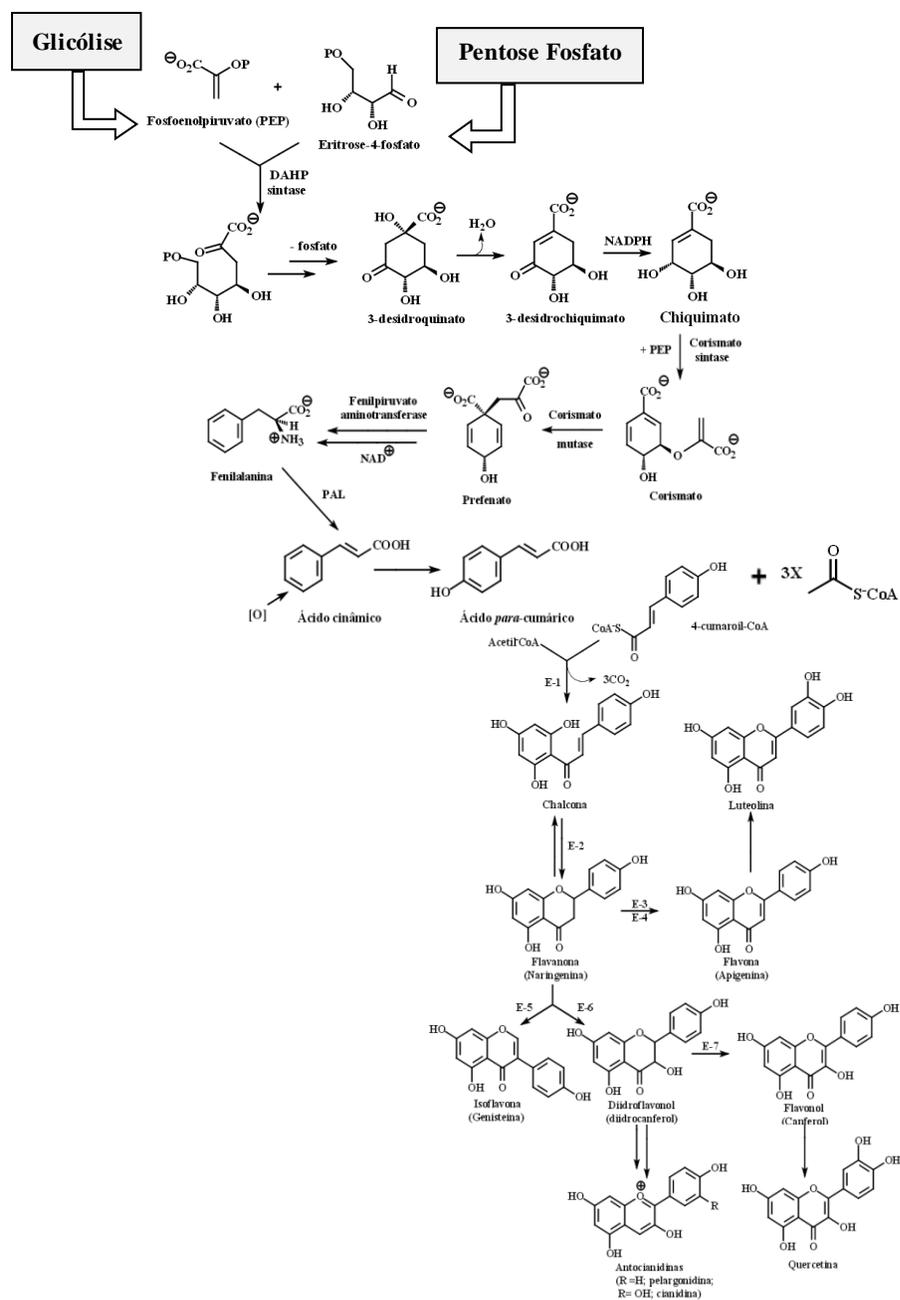


Figura 1 Biossíntese de compostos fenólicos
Adaptado de Lianda (2009)

A distribuição dos compostos fenólicos nos tecidos das plantas não é uniforme. Os compostos fenólicos solúveis encontram-se compartimentalizados dentro dos vacúolos celulares (BECKMAN, 2000) e estão na forma livre ou conjugada, enquanto os fenólicos insolúveis encontram-se ligados a estruturas da parede celular, esterificados com arabinose ou resíduos de galactose dos componentes pécnicos ou hemicelulósicos (FAULDS; WILLIAMSON, 1999).

Existem cerca de cinco mil fenóis distribuídos entre o reino vegetal, dentre eles destacam-se os ácidos fenólicos, os taninos, os flavonoides e os tocoferóis.

Os ácidos fenólicos compreendem os derivados do ácido benzoico e do ácido cinâmico. Os hidroxibenzoicos, têm sete átomos de carbono e são os ácidos fenólicos mais simples da natureza, que incluem os ácidos gálico, *p*-hidroxibenzoico, protocatecuico, vanílico e siríngico. Já os ácidos hidroxicinâmicos e seus derivados por ciclização, como cumarina, ácido cafeico, clorogênico e ferúlico, apresentam nove átomos de carbono (SOARES; ANDREAZZA; SALVADOR, 2005).

Já os taninos são polifenóis de peso molecular relativamente alto, tendo importância por seus efeitos anti-inflamatórios, anticarcinogênicos e cicatrizantes. São divididos em taninos hidrolisáveis e condensáveis, sendo os hidrolisáveis polímeros formados por moléculas de ácidos gálicos e elágicos glicosilados. Por sua vez, os taninos condensados, denominados proantocianidinas, são oligômeros e polímeros de flavan-3-ol (catequina) e/ou flavan-3,4-diol (leucocianidina) e apresentam maior importância nos alimentos, provavelmente por apresentarem pigmentos avermelhados (ANGELO; JORGE, 2007; MONTEIRO et al., 2005). O elevado peso molecular dos taninos confere aos alimentos em que eles estão presentes uma sensação de adstringência (DREWNOWSKI; GOMEZ-CARNEROS, 2000).

Os flavonoides representam o maior e principal grupo de compostos fenólicos, com mais de 5.000 diferentes flavonoides descritos. Geralmente, encontram-se conjugados com glicosídeos e, ocasionalmente, na forma de agliconas, sendo que os primeiros têm maior solubilidade (ROSS; KASUM, 2002; WOLFE; LIU, 2008). Quimicamente, os flavonoides são compostos fenólicos muito instáveis e altamente susceptíveis à degradação, cuja estabilidade é afetada por diversos fatores, como pH, temperatura, concentração de oxigênio e luminosidade. O pH ácido é favorável para a forma colorida desses pigmentos e a temperatura elevada pode favorecer a degradação e a polimerização da cor desses pigmentos (CASTAÑEDA-OVANDO et al., 2000; SALUNKHE; BOLIN; REDDY, 1991). Entre os principais flavonoides estão antocianinas, flavonas, isoflavonas, flavonóis e flavanonas (CHITARRA; CHITARRA, 2005).

As antocianinas constituem um representante de relevância desta classe; são pigmentos dissolvidos na seiva dos tecidos das flores e frutas, que dão coloração rosa, vermelho, azul ou violeta. Elas existem em diversas formas químicas, coloridas e não coloridas, de acordo com o pH. Embora sejam altamente instáveis na forma aglicona, enquanto presentes nas plantas, são resistentes à luz, ao pH e às condições de oxidação, que são suficientes para degradá-las. A degradação é diminuída pela glicosilação e pela esterificação com vários ácidos, como o cítrico e o málico, além de ácidos fenólicos (LIANDA, 2009).

Os tocoferóis são compostos monofenólicos existentes em vegetais, principalmente em sementes oleaginosas e folhas, que têm atividade antioxidante e de vitamina E. Eles estão agrupados em duas séries de compostos que têm estrutura química semelhante e recebem o nome genérico de tocóis e tocotrienóis. Os compostos da série tocóis têm cadeia saturada ligada ao anel e são denominados tocoferóis, enquanto os da série tocotrienóis têm cadeia

insaturada. A nomenclatura desses compostos recebe o prefixo de α , β , γ e δ , dependendo do número e da posição do grupo metila ligado ao anel aromático. O α -tocoferol é o composto que apresenta maior atividade de vitamina E (ANGELO; JORGE, 2007).

Os compostos fenólicos exibem uma variedade de propriedades fisiológicas, tais como antialérgica, antiarterogênica, anti-inflamatória, antimicrobiana, antitrombótica, antioxidante e efeito cardioprotetor e vasodilatador (BENAVENTE-GARCIA et al., 1997; PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2001).

Rufino et al. (2009), avaliando a quantidade de fenólicos totais presentes na mangaba, verificaram que o fruto apresenta-se como uma boa fonte destes compostos, concentrando cerca de 172 mg de ácido gálico.100 g⁻¹ de fruto. Rufino et al. (2010) encontraram valores muito semelhantes, cerca de 169 mg de ácido gálico.100 g⁻¹ de fruto e valores na ordem de 0,4 mg.100 g⁻¹ para antocianinas totais.

Almeida et al. (2011), avaliando o conteúdo fenólico de diferentes espécies nativas do Brasil, ciriguela, jaca, mangaba, murici, mamão, ananás, sapoti, graviola, pinha, tamarindo e umbu, encontraram o segundo maior conteúdo de fenólicos totais (98,8 mg GAE/100 g⁻¹), menor somente que o do murici e um teor considerável de antocianinas totais, colocando-o na quarta posição (0,79 mg antocianinas totais/100 g).

Tem sido relatada a presença de flavonoides, catequinas, proantocianidinas e taninos na casca de *H. speciosa*; em adição, esteroides, triterpenos e taninos estão presentes nas folhas (HONDA et al., 1990; MORAES et al., 2008). As análises do látex indicam a presença de flavonoides e diterpenos (HONDA et al., 1990; MARINHO et al., 2011). Um estudo químico realizado em extratos etanólico das folhas e mangaba indicou o flavonoide rutina como um dos principais constituintes (FERREIRA et al., 2007a).

Testes farmacológicos preliminares e a utilização de padrões revelaram a presença de substâncias fenólicas, tais como catequina e ácido clorogênico no decocto das cascas deste vegetal (ANDRADE, 2002). Outros estudos com a fração acetato de etila da infusão das cascas da mangaba levaram ao isolamento de ácidos fenólicos, tais como gálico, ácido clorogênico e 4-hidroxi-3,5-dimetoxibenzóico (ácido siríngico) (RODRIGUES; CARVALHO, 2001).

Em se tratando da avaliação do fruto, Assumpção et al. (2014), por meio de triagem fitoquímica, revelaram a presença de fenóis e flavonoides no extrato etanólico da mangaba. Já Gomes, Ramalho e Gualberto (2013) relataram altas concentrações de ácido clorogênico ($113,4 \text{ g} \cdot \text{g}^{-1}$).

Verifica-se, portanto um levantamento da constituição fenólica da *Hancornia speciosa*, direcionado mais as folhas, ao caule e ao látex; em contrapartida, são escassos os trabalhos avaliando o perfil fenólico do fruto.

Almeida et al. (2011), realizando a correlação de Pearson entre atividade antioxidante total, compostos fenólicos, vitamina C e antocianinas totais, verificaram que houve correlação somente entre os compostos fenólicos e a capacidade antioxidante total, não havendo relação da capacidade antioxidante com as demais moléculas avaliadas. Estes resultados sugerem que os compostos fenólicos são os mais importantes constituintes para a atividade antioxidante dos frutos estudados nessa pesquisa. Contudo, a atividade antioxidante dos frutos analisados não pode ser atribuída exclusivamente aos seus conteúdos fenólicos, mas também para as ações dos diferentes compostos antioxidantes presentes nas frutas e em possíveis efeitos sinérgicos e antagonistas ainda desconhecidos.

A eficiência antioxidante de compostos bioativos em alimentos de origem vegetal depende de sua estrutura e da sua concentração no alimento. Por sua vez, a quantidade dessas substâncias em vegetais é amplamente influenciada por fatores genéticos, grau de maturação, variedade da planta, condições

ambientais, tipo de processamento, tempo de armazenamento e modo de acondicionamento, dentre outros (OLIVEIRA et al., 2009).

2.4 Atividades biológicas da *Hancornia speciosa*

Algumas partes da mangabeira encontram aplicação na medicina popular, como a casca, a folha, a raiz e o látex. As cascas são utilizadas em infusão para o tratamento de hipertensão, úlcera gástrica, perturbações do estômago, doenças inflamatórias (ALMEIDA et al., 1998), dermatite, diabetes e doenças hepáticas (BRITTO; BRITTO, 1982; GRANDI; LIMA-FILHO; FERREIRA, 1982; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990). Há um uso extensivo do látex para o tratamento de doenças relacionadas com infecção fúngica, tuberculose, úlceras, acne, verrugas e estímulo da função hepática (POTT; POTT, 1994). Já suas raízes e as folhas são empregadas para o tratamento de reumatismo e hipertensão (BRITTO; BRITTO, 1982; GRANDI; LIMA-FILHO; FERREIRA, 1982; HIRSCHMANN; ARIAS, 1990).

Extrapolando seu uso popular, alguns efeitos farmacológicos da *H. speciosa* têm sido relatados na literatura científica. De acordo com Serra et al. (2005), foi verificado que o extrato etanólico das folhas da *H. speciosa* exerce hipotensão por meio da inibição da enzima conversora da angiotensina (ACE), enzima esta com alta atividade vasodilatadora.

Em estudo realizado com ratos *Wistar* machos, para investigar os efeitos cardiovasculares induzidos pelas folhas da *H. speciosa*, Ferreira et al. (2007a) demonstraram que o extrato etanólico da *H. Speciosa* induz uma potente vasodilatação na aorta de ratos por meio da ativação de um mecanismo dependente da produção de óxido nítrico, provavelmente pela ativação de fosfatidil-inositol 3-quinase.

Ferreira et al. (2007b) descrevem um efeito vasodilatador endotélio-dependente do extrato das folhas de *H. speciosa* em anéis de artéria superior mesentérica de ratos, por meio de um mecanismo dependente de liberação de óxido nítrico e fator derivado do endotélio hiperpolarizante. Além disso, tais autores descrevem um flavonoide, a rutina, como o possível composto responsável pelo efeito vasodilatador da *H. speciosa*.

Avaliando-se o efeito hipotensor das folhas da *H. speciosa* sobre camundongos *Swiss* (SILVA et al., 2011), verificou-se a redução da pressão arterial sistólica, resultados estes que corroboram o uso tradicional da *H. speciosa* na medicinal tradicional como anti-hipertensivo.

Moraes et al. (2008), avaliando o efeito gastroprotetor da infusão de cascas da *H. speciosa*, verificaram sua eficácia no combate e na cura de úlceras em ratos *Wistar*, com base na sua capacidade para estimular a síntese de muco, mostrando, ainda, efeito contra *Helicobacter pylori*, sem causar aparecimento de toxicidade.

Marinho et al. (2011) demonstraram que o látex obtido a partir de *H. speciosa* tem atividade anti-inflamatória em ratos *Wistar* machos. Também verificaram ausência de efeito tóxico do látex, fornecendo evidências de que a *H. speciosa* pode ser utilizada como uma terapia promissora como adjuvante no alívio de vários tipos de inflamação.

A administração do látex de *H. speciosa* (5%, 10%, 15% e 50%) em camundongos, diariamente, durante 15 dias, promoveu redução significativa do peso médio corporal, quando comparados ao controle (VRATIMOS; BRANDÃO; SILVA, 2006).

Alguns trabalhos nos quais se avalia a atividade antimicrobiana da mangaba também podem ser encontrados na literatura. Santos et al. (2007), testando o potencial do látex da mangabeira frente a diferentes microrganismos, utilizando as técnicas de difusão em discos e adição do látex em diferentes

concentrações ao meio de cultura, encontraram ausência total de atividade antimicrobiana do látex.

Resultados negativos também foram encontrados por Carraza et al. (2011), avaliando a capacidade antimicrobiana de três tipos de extratos da mangabeira (hidroalcólico de folhas, hidroalcólico de cascas do caule e extrato aquoso das folhas) em três diferentes concentrações (50, 100 e 500 Vg/ml salina), pelo método de difusão em disco de papel, à susceptibilidade de cepas de bactérias gram-positivas (*Enterococcus faecalis*, *Staphylococcus aureus*) e gram-negativa (*Escherichia coli*). O autor obteve resultados negativos, ou seja, os extratos da mangabeira não apresentaram atividade antimicrobiana.

Os extratos hexânico e etanólico obtidos das folhas de *H. speciosa* não inibiram o crescimento dos fungos *Mucor hiemalis*, *Rhizopus* sp., *Geotrichum candidum*, *Penicillium* sp., *Epidermophyton floccosum*, *Trichophyton mentagrophytes*, *Candida parapsilosis* e *Aspergillus fumigatus* (BARROS, 2008).

Ribeiro et al. (2012), investigando o potencial de extrato de hexano-metanólico da casca, folhas, látex e frutas contra tumores *in vitro* específicos (carcinoma do cólon, melanoma, glioblastoma e leucemia), constataram que *H. speciosa* não seria ativa.

Por fim, Barros (2008), realizando bioensaio envolvendo *Artemia salina*, um microcrustáceo, para avaliar a toxicidade de substâncias químicas, verificou que os extratos hexânico e etanólicos de *H. speciosa* avaliados apresentaram baixa toxicidade às larvas de *A. salina*. Já Assumpção et al. (2014) observaram potencial citotóxico do extrato etanólico da mangaba fruta contra *Artemia salina*.

Sendo assim, verifica-se que alguns efeitos farmacológicos da *H. speciosa* têm sido relatados. Contudo, eles se concentram, quase em sua

totalidade, no estudo de folhas, casca e látex, sendo necessários mais trabalhos para se avaliar o potencial do fruto.

2.5 Câncer e drogas indutoras

O material genético de todos os seres vivos é composto por DNA (ácido desoxirribonucleico) e toda a informação genética é armazenada na forma de bases nitrogenadas sequenciadas (LEWIN, 2001). Devido à sua substancial função no organismo dos seres vivos, o DNA é a única molécula a possuir um mecanismo próprio de reparo de falhas em seu metabolismo para a sua proteção, bem como um sistema próprio de prevenção (LEHNINGER; NELSON; COX, 1995).

No decorrer da vida, apesar de dispor de mecanismos próprios de prevenção e reparo, o DNA ainda está suscetível à ocorrência de alterações súbitas, as chamadas mutações (ZAHA, 1996). Estas mutações podem ser causadas por erros, durante a sua duplicação, na divisão celular; durante a duplicação do DNA, na divisão celular e podem ser espontâneas (quando geradas a partir de processos celulares naturais) ou induzidas (quando causadas pela exposição a agentes físicos, químicos, biológicos ou genéticos) (LEWIN, 2001). Algumas lesões, ou mesmo erros espontâneos, durante a replicação do DNA, quando não são reparadas, podem resultar em evento mutagênico (RAMEL, 1984; TUCKER; PRESTON, 1996).

O interesse por essas mutações no organismo é notável, pois elas estão diretamente relacionadas com o aparecimento e o desenvolvimento de várias doenças crônicas não transmissíveis, especialmente o câncer que, segundo a Organização Mundial de Saúde (2012 apud INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA - INCA, 2015), figura entre as principais causas de mortalidades em todo o mundo. Após passar por várias

divisões, uma célula poderá acumular mutações que, se em número elevado, poderão determinar a perda do controle de sua divisão, determinando assim um crescimento desordenado das células, gerando o aparecimento de câncer. Assim, os mecanismos de mutagênese e carcinogênese estão intimamente relacionados; a mutação é uma consequência do dano ao DNA e este pode ser o estágio inicial na promoção de uma neoplasia (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

Carcinogênese é um termo genérico que compreende os vários mecanismos que participam do desenvolvimento de neoplasias malignas. É um processo multissequencial complexo que conduz uma célula saudável para um estado pré-neoplásico e, finalmente, para uma fase de cancro (VALKO et al., 2006). Ela pode ocorrer de forma espontânea ou ser induzida por agentes físicos, químicos, biológicos ou genéticos.

Durante o processo de carcinogênese, uma célula normal passará por várias etapas: iniciação, promoção, progressão e a manifestação do tumor, como apresentado na Figura 2.

Iniciação envolve uma mutação não letal no DNA que produz uma célula alterada (VALKO et al., 2006). A etapa de iniciação corresponde ao primeiro passo no processo de carcinogênese, que corresponde à transformação celular induzida por agentes mutagênicos, causando modificações genéticas no DNA. Estas transformações tornam a célula propensa a desenvolver tumor, porém, a iniciação somente não é suficiente para a formação do mesmo (BRASILEIRO FILHO; PEREIRA; GUIMARÃES, 2006). Assim, todo iniciador da carcinogênese é um agente genotóxico, embora nem todas as substâncias genotóxicas iniciem o processo de carcinogênese (PITOT; DRAGAN, 2001).

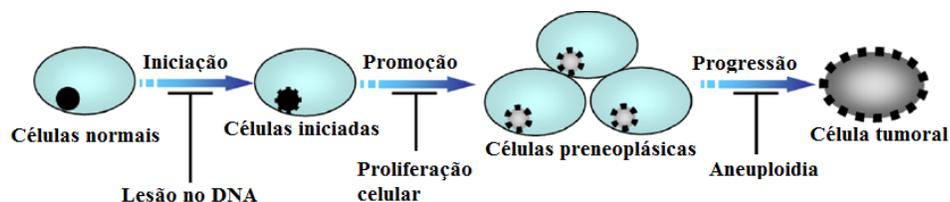


Figura 2 Estágios de iniciação, promoção, progressão e manifestação da carcinogênese.

Fonte: Pitot (1993) e Tao et al. (2008)

A promoção, por sua vez, é a etapa caracterizada pela expansão das células iniciadas pela indução da proliferação celular, e/ou inibição de morte celular programada, favorecendo o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas, como os focos de células alteradas identificáveis (BANNASCH, 1986; VALKO et al., 2006).

A progressão, por sua vez, é caracterizada por alterações celulares, morfológicamente, por anaplasia e, biologicamente, por crescimento autônomo (PITOT, 1989). Esta fase é irreversível e é caracterizada pela acumulação de danos genéticos adicionais, levando à transição da célula no estágio benigno para o maligno (VALKO et al., 2006). Quando as células adquirem a capacidade de invasão tecidual e de metástases, tem-se a última etapa, a manifestação clínica da doença (YUSPA; HENNINGS; LICHTI, 1981).

Para a avaliação do potencial antimutagênico/mutagênico de um composto, é necessária a utilização de um fármaco capaz de induzir danos ao DNA. Agentes genotóxicos são, geralmente, produtos químicos que danificam diretamente o DNA que, por sua vez, leva à mutação e a alterações clastogênicas (VALKO et al., 2006). Para ajudar a compreender melhor o mecanismo da carcinogênese, os agentes genotóxicos foram introduzidos.

Nas últimas décadas, diversos modelos experimentais têm sido desenvolvidos em animais, utilizando-se compostos químicos indutores da formação e do desenvolvimento de tumores (LARANJEIRA et al., 1998),

muitos com características semelhantes às daqueles de ocorrência natural visando à obtenção de informações sobre a gênese, evolução, bem como métodos de diagnóstico e terapias mais eficazes frente a essas neoplasias (SHETYE et al., 1990). A 1,2-dimetil-hidrazina e a doxorubicina são drogas utilizadas em estudos para a avaliação de genotoxicidade.

A 1,2-dimetil-hidrazina (DMH) (Figura 3) é uma das drogas mais utilizadas nos estudos da carcinogênese de cólon. Trata-se, portanto, de um pró-carcinógeno, uma vez que necessita ser metabolicamente convertida no fígado. Sua ligação ao oxigênio ligado ao carbono seis da guanina (*O6-MeG*) no DNA altera a ligação de hidrogênio, leva a um erro de leitura pelo DNA polimerase e resulta em transcrição G:A (LEVI et al., 2009). Essa droga tem a capacidade de promover hipermetilação do DNA das células epiteliais colônicas (HOFFMAN-GOETZ, 2003).

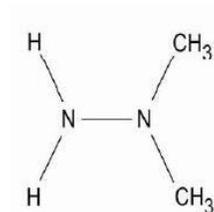


Figura 3 Estrutura química da 1,2-dimetilhidrazina

A DMH induz a proliferação de tumores no cólon em grande número, principalmente no sigmoide e reto, podendo, ocasionalmente, ocorrer ao redor da junção duodeno-jejunal (LARANJEIRA et al., 1998). A preferência pelo cólon é explicada pela proliferação celular mais intensa, induzida pela DMH, nesse local, principalmente no segmento distal do que no restante do intestino. Associa-se também deficiência nos mecanismos de reparo do DNA nesse segmento (BERRIEL et al., 2005).

Já a doxorubicina (DXR) é um antibiótico isolado de culturas de *Streptomyces peucetius*, cuja fórmula molecular é $C_{24}H_{29}NO_{11}$ (Figura 4). É um dos mais ativos agentes antitumorais utilizados em oncologia clínica e experimental, empregado especialmente no tratamento de leucemia aguda e linfoma, mas também para alguns tumores sólidos, tais como cânceros do ovário, mama e do endométrio (KAKLAMANI; GRADISHAR, 2003; WEISS, 1992).

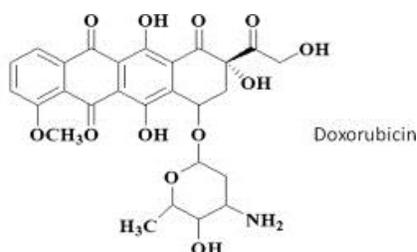


Figura 4 Estrutura química da doxorubicina

Esse antibiótico antineoplásico do tipo intercalante pertence ao grupo das antraciclínas, sendo o anel antraciclínico lipofílico e tem uma série de hidroxilas na porção saturada, juntamente com grupos aminoaçúcares, conferindo-lhe caráter hidrofílico. Ou seja, a DXR tem anfotericidade, uma vez que tem características ácidas na porção fenólica e características básicas na porção dos aminoaçúcares. Com isso, sua passagem através das membranas fica facilitada (SINGAL et al., 2000).

A DXR tem um anel de quinona e de hidroquinona que funciona como doador e acceptor de elétrons, sendo um potente gerador de radicais livres. Esses radicais geram danos induzidos nas macromoléculas celulares durante uma situação de desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, comumente chamada de estresse oxidativo (SIES, 1993). Tem como consequências a indução de aberrações cromossômicas (RUEFF et al., 1993), o desenvolvimento de tumores (CERUTTI, 1994), a degeneração celular que leva ao processo de

envelhecimento (AMES et al., 1993) e o desencadeamento de cardiotoxicidade, que é causada pela geração de espécies reativas de oxigênio. Estas, por sua vez, teriam a capacidade de lesionar a célula, desencadeando a formação de desordens e o desenvolvimento de uma cardiomiopatia e possível insuficiência cardíaca.

Atualmente, as principais hipóteses sobre os mecanismos de ação de substâncias que provocam câncer estão baseadas na indução de danos ao DNA celular e mutações em células somáticas. Praticamente todos os agentes mutagênicos químicos e físicos capazes de provocar câncer resultam na geração de mutações de diferentes tipos. Dessa forma, torna-se essencial dispor de métodos confiáveis, simples e rápidos para avaliar corretamente o potencial cancerígeno de um material (MOREIRA et al., 2002).

Dentre os testes de avaliação de genotoxicidade preconizados pelas agências internacionais e instituições governamentais, o teste de micronúcleo é amplamente aceito e recomendado para a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (CHOY, 2001; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003).

O teste do micronúcleo, realizado em mamíferos, é um ensaio *in vivo* capaz de detectar substâncias clastogênicas, ou seja, aquelas que causam quebras no cromossomo, e também substâncias aneuploidiogênicas, isto é, que alteram a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (HEDDLE et al., 1983).

Os micronúcleos aparecem nas células filhas em decorrência de danos induzidos nas células parentais. São estruturas originadas de fragmentos cromatídicos, cromossômicos e, até mesmo, de cromossomos inteiros, não incorporados às células-filhas durante o processo de divisão celular (REIS et al., 2004). Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras, que não são integrados ao conjunto de cromossomos de uma célula, podem ser envolvidos

por uma membrana celular que se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula, chamado de micronúcleo, como pode ser observado na Figura 5 (CAPRIGLIONE et al., 2011; RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Sendo assim, este teste baseia-se na contagem desses núcleos diminutos no citoplasma de células recém-formadas (REIS et al., 2004).

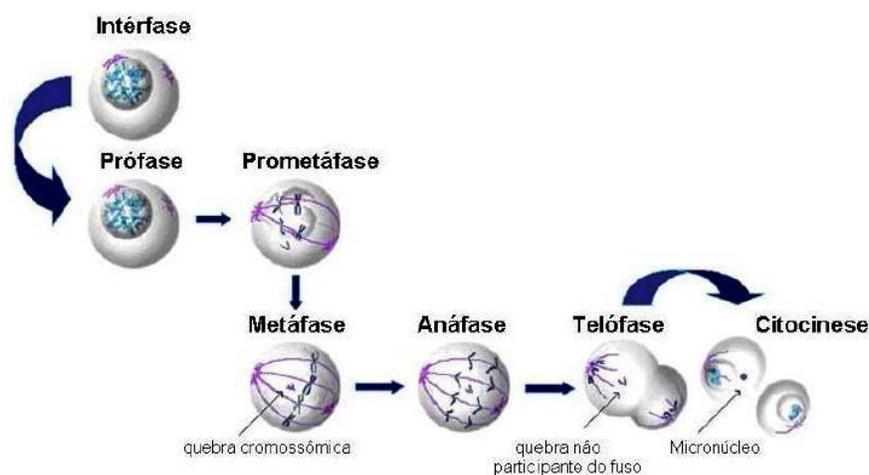


Figura 5 Formação de micronúcleo a partir de quebras cromossômicas que não foram incorporadas ao núcleo celular principal

Fonte: Jacobowski (2009), adaptado de Albert et al. (2010)

Comparado com outros testes *in vivo*, o teste do micronúcleo é tecnicamente mais simples, pode ser conduzido em menor tempo, tem resultado menos subjetivo e requer o uso de menor número de animais (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Além disso, o teste tem reprodutibilidade efetiva e satisfatória, uma vez que foi utilizado e adaptado por diversos pesquisadores no estudo de diferentes espécies (GARAJ-VRHOVAC; ZELJEZIC, 2001; HERNANDES et al., 2014; MALTA et al., 2012; RIBEIRO et al., 2010; SILVA et al., 2014).

O teste de micronúcleo, seja de medula óssea ou de demais órgãos, como o cólon, bem como o teste do cometa e a avaliação de células apoptóticas, tem sido amplamente utilizado como ferramentas para verificar a genotoxicidade de agentes ambientais. Rothfuss et al. (2011) relatam que a combinação de diferentes testes tem sido geralmente empregada em estudos de genotoxicidade, devido à possibilidade de utilizar vários órgãos-alvo no mesmo animal, bem como a possibilidade de avaliar diferentes mecanismos genéticos.

O ensaio cometa não é utilizado para detectar mutações, mas, sim, lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o teste do Cometa pode ser também utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética da lesão reparada (SNYDER; GREEN, 2001).

O comportamento do DNA em células individualizadas leva em conta sua organização dentro do núcleo. Para ser compactado, após o enovelamento com proteínas histônicas, o DNA forma alças que são aderidas a uma rede proteica ou matriz nuclear. Se células embebidas em agarose tiverem suas membranas lisadas por detergentes e suas proteínas nucleares extraídas com altas concentrações de sais, o DNA, maior e mais pesado que o restante dos outros componentes, ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula (GONTIJO; TICE, 2003). Caso estas células sejam expostas a uma microeletroforese, o DNA irá migrar, podendo ser visualizado ao microscópio com corantes específicos para DNA, tendo a aparência semelhante à de um cometa. Para a interpretação dos resultados, o “cometa” é dividido em duas partes: cabeça e cauda. Células com pouco dano no DNA não apresentam cauda, permanecendo similares aos núcleos, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores.

Se o dano ao DNA é intenso, existe um mecanismo importante que elimina células alteradas de forma seletiva. Este processo é chamado de apoptose, que é um processo fisiológico normal, no qual as células iniciam um mecanismo de morte celular programada (VALKO et al., 2006). Apoptose é um mecanismo importante para eliminar células aberrantes do organismo (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Este processo pode ocorrer diante de inúmeras situações de risco para o organismo, incluindo a eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (RANGANATH; NAGASHREE, 2001).

Ao longo do processo de apoptose, a célula passa por alterações morfológicas específicas e coordenadas que, no geral, ocorrem de forma bastante rápida. Essas alterações incluem a retração da célula, o que ocasiona a perda de aderência com a matriz extracelular e as células vizinhas. No geral, as organelas celulares mantêm a sua morfologia intacta, porém, as mitocôndrias podem apresentar, em alguns casos, a ruptura da membrana externa. Também ocorrem condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação dos corpos chamados corpos apoptóticos. Esses corpos apoptóticos são, então, fagocitados e removidos sem o desencadeamento de um processo inflamatório (ZIEGLER; GROSCURTH, 2004).

O processo de apoptose, além de ser um mecanismo de defesa do organismo e representar uma importante função no controle de inúmeros processos vitais, está também relacionado a diversas doenças, como o câncer (GRIVICICH; REGNER; ROCHA, 2007). Desde os estágios iniciais da mutagênese, o mecanismo já é ativado para remover as células com danos causados por agentes genotóxicos e, por isso, avaliação na frequência de células apoptóticas em determinados tecidos é utilizada em estudos de toxicidade.

Por tudo que foi exposto, confirma-se que o interesse pelo diagnóstico de produtos que possam ter propriedades antimutagênicas ou anticarcinogênicas

tem aumentado consideravelmente ao longo das últimas décadas, uma vez que o conhecimento do perfil de tais produtos pode ser benéficamente utilizado como medida preventiva para a saúde humana. A descoberta de produtos que diminuam o número de mutações certamente reduziria a incidência de câncer na população, pois haveria um crescimento da exposição a certos agentes antimutagênicos efetivos (HAYATSU; ARIMOTO; NEGISHI, 1988), principalmente por meio de dietas (RAMEL, 1986; WATTEMBERG, 1983).

REFERÊNCIAS

ABREU, W. C. **Características físicas, químicas e atividade antioxidante “in vitro” de tomate submetido à desidratação**. 2010. 156 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) - Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2010.

ALBERT, B. et al. **Biologia molecular da célula**. 5. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2010. 1396 p.

ALMEIDA, M. M. B. et al. Avaliação de macro e microminerais em frutas tropicais cultivadas no nordeste brasileiro. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 29, n. 3, p. 581-586, jul./set. 2009.

ALMEIDA, M. M. B. et al. Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2155-2159, Aug. 2011.

ALMEIDA, S. P. et al. **Cerrado: espécies vegetais úteis**. Planaltina: EMBRAPA, 1998. 38 p.

AMBRÓSIO, C. L. B.; CAMPOS, F. D. C. S.; FARO, Z. P. Carotenoides como alternativa contra a hipovitaminose A. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 19, n. 2, p. 233-243, 2006.

AMES, B. N. Dietary carcinogens and anticarcinogens: oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, Washington, v. 221, n. 4617, p. 1256-1264, 1983.

ANDERSON, D. Antioxidant defences against reactive oxygen species causing genetic and other damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 350, n. 1, p. 103-108, 1996.

ANDRADE, F. D. **Estudos químicos de chás brasileiros**. 2002. 111 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Estadual Paulista, Araraquara, 2002.

ANGELO, P. M.; JORGE, N. Compostos fenólicos em alimentos: uma breve revisão. **Revista Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v. 66, n. 1, p. 232-240, 2007.

ASSUMPCÃO, C. F. et al. Characterization, antioxidant potential and cytotoxic study of mangaba fruits. **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 7, p. 1297-1303, July 2014.

BANNASCH, P. Preneoplastic lesion as end-points in carcinogenicity testing. **Carcinogenesis**, Oxford, v. 7, p. 689-695, 1986.

BARROS, D. I. et al. Métodos de extração de sementes de mangaba visando à qualidade fisiológica. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 28, n. 1, p. 25-27, abr. 2006.

BARROS, I. M. de C. **Contribuição ao estudo químico e biológico de *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae)**. 2008. 194 p. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

BECKMAN, C. H. Phenolic-storing cells: keys to programmed cell death and periderm formation in wilt disease resistance and in general defence responses in plants? **Physiological and Molecular Plant Pathology**, London, v. 57, n. 3, p. 101-110, Sept. 2000.

BENAVENTE-GARCIA, O. et al. Uses and properties of citrus flavonoids. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v. 45, n. 12, p. 4505-4515, Dec. 1997.

BERRIEL, E. et al. Simple mcin-type cancer associated antigens are pre-cancerous biomarkers during, 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon carcinogenesis. **Oncology Reports**, Athens, v. 14, n. 1, p. 219-227, July 2005.

BIACHI, M. L. P.; ANTUNES, L. M. G. Radicais livres e os principais antioxidantes da dieta. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 2, p. 123-130, maio/ago. 1999.

BORGUINI, R. G. **Avaliação do potencial antioxidante e de algumas características físico-químicas do tomate (*Lycopersicon esculentum*) orgânico em comparação ao convencional**. 2006. 178 p. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

BRASILEIRO FILHO, G.; PEREIRA, F. E. L.; GUIMARÃES, R. C. Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. (Ed.). **Bogliolo patologia**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006. p. 188-236.

BRITTO, K. B.; BRITTO, I. C. Plantas com atributos medicinais do Herbário da Universidade de Feira de Santana. **Oréades**, Salvador, v. 8, p. 152-163, 1982.

CAPRIGLIONE, T. et al. Genotoxic effects of the fungicide thiophanate-methyl on *Podarcis sicula* assessed by micronucleus test, comet assay and chromosome analysis. **Ecotoxicology**, New York, v. 20, n. 4, p. 885-891, June 2011.

CARDOSO, M. C. et al. Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) from the Brazilian Cerrado: nutritional value, carotenoids and antioxidants vitamins. **Fruits**, Paris, v. 69, n. 2, p. 89-99, Mar./Apr. 2014.

CARNELOSSI, M. A. G. et al. Conservação pós-colheita de mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 28, n. 5, p. 1119-1125, set./out. 2004.

CARRAZZA, T. G. et al. Atividade antimicrobiana de extratos da Mangabeira (*Hancornia speciosa* GOMES). **PUBVET**, Londrina, v. 5, n. 7, 2011.
Disponível em:
<<http://www.cabdirect.org/abstracts/20113177240.html;jsessionid=D123DD77A6062E0817905B142D1F0F24>>. Acesso em: 10 mar. 2015.

CASTAÑEDA-OVANDO, A. et al. Chemical studies of anthocyanins: a review. **Food Chemistry**, Kidlington, v. 113, n. 4, p. 859-871, Apr. 2009.

CERQUEIRA, F. M.; MEDEIROS, M. H. G.; AUGUSTO, O. Antioxidantes dietéticos: controvérsias e perspectivas. **Química Nova**, São Paulo, v. 30, n. 2, p. 441-449, 2007.

CERUTTI, P. A. Oxy-radicals and cancer. **The Lancet**, London, v. 344, n. 8926, p. 862-863, 1994.

CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2. ed. Lavras: UFLA, 2005. 785 p.

CHOY, W. N. Regulatory genetic toxicology tests. In: _____. **Genetic toxicology and cancer risk assessment**. New York: M. Dekker, 2001. p. 93-113.

- CLERICI, M. T. P. S.; CARVALHO-SILVA, L. B. Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 1658-1670, 2011.
- COZZOLINO, S. M. F. **Biodisponibilidade de nutrientes**. 2. ed. São Paulo: Manole, 2007. 992 p.
- DAS, S. et al. Role of ascorbic acid in vitro oxidation of low-density lipoprotein derived from hypercholesterolemic patients. **Clinica Chimica Acta**, Amsterdam, v. 372, n. 1/2, p. 202-205, May 2006.
- DREWNOWSKI, A.; GOMEZ-CARNEROS, C. Bitter taste, phytonutrients, and the consumer: a review. **The American Journal of Clinical Nutrition**, New York, v. 72, n. 6, p. 1424-1435, 2000.
- DUARTE-ALMEIDA, J. M. et al. Avaliação da atividade antioxidante utilizando sistema β -caroteno/ácido linoléico e método de seqüestro de radical DPPH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 26, n. 2, p. 446-452, abr./jun. 2006.
- EPSTEIN, L. Mangaba: coisa boa de comer. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 6, n. 2, p. 1-4, jun. 2004.
- FANTINI, A. P. et al. Disponibilidade de ferro em misturas de alimentos com adição de alimentos com alto teor de vitamina C e de cisteína. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 2, p. 435-439, abr./jun. 2008.
- FAULDS, C. B.; WILLIAMSON, G. The role of hydroxycinnamates in the plant cell wall. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, London, v. 79, n. 3, p. 393-395, 1999.
- FERREIRA, H. C. et al. Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. **Phytomedicine**, Jena, v. 14, p. 473-478, 2007a.
- FERREIRA, H. C. et al. Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidylinositol 3-kinase. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 109, p. 161-164, 2007b.
- FERRI, M. G. Ecologia dos cerrados. In: SIMPÓSIO SOBRE O CERRADO, 4., 1977, São Paulo. **Anais...** São Paulo: EDUSP, 1977. p. 15-33.

GANGA, R. M. D.; CHAVES, L. J.; NAVES, R. V. Parâmetros genéticos em progênies de *Hancornia speciosa* Gomes do Cerrado. **Scientia Forestalis**, Piracicaba, v. 37, n. 84, p. 395-404, Dec. 2009.

GARAJ-VRHOVAC, V.; ZELJEZIC, D. Assessment of genome damage in a population of Croatian workers employed in pesticide production by chromosomal aberration analysis, micronucleus assay and Comet assay. **Journal of Applied Toxicology**, Chichester, v. 22, n. 4, p. 249-255, 2002.

GOMES, E. D. B.; RAMALHO, S. A.; GUALBERTO, N. C. A rapid method for determination of some phenolic acids in Brazilian tropical fruits of mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Camara) by UPLC. **Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation**, Wuhan, v. 3, n. 3A, p. 1-10, Dec. 2013.

GONTIJO, A. M. C.; TICE, R. Teste do cometa para a detecção de dano no DNA e reparo em células individualizadas. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Ed.). **Mutagênese ambiental**. Brasília: ULBRA, 2003. p. 247-279.

GRANDI, T. M. S.; LIMA-FILHO, F. M.; FERREIRA, S. M. A. Levantamento das plantas medicinais de Grão Mogol. **Oreades**, Feira de Santana, v. 8, p. 116-125, 1982.

GRIVICICH, I.; REGNER, A.; ROCHA, A. B. D. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**, São Paulo, v. 53, n. 3, p. 335-343, 2007.

HAYATSU, H.; ARIMOTO, S.; NEGISHI, T. Dietary inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, Amsterdam, v. 202, n. 2, p. 429-446, 1988.

HEDDLE, J. A. et al. The induction of micronuclei as a measure of genotoxicity: a report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, Amsterdam, v. 123, n. 1, p. 61-118, 1983.

HERNANDES, L. C. et al. In vivo assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. **Food Research International**, Barking, v. 62, p. 121-127, Aug. 2014.

HIRSCHMANN, G. S.; ARIAS, A. R. A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 29, n. 2, p. 159-172, May 1990.

HOFFMAN-GOETZ, L. Physical activity and cancer prevention: animal-tumor models. **Medicine & Science in Sports & Exercise**, Hagerstown, v. 35, n. 11, p. 1828-1833, 2003.

HONDA, N. K. et al. Estudo químico de plantas de Mato Grosso do Sul I: triagem fitoquímica. **Revista Científica e Cultural**, Campo Grande, v. 5, p. 37-46, 1990.

HUANG, D.; OU, B.; PRIOR, R. The chemistry behind antioxidant capacity assays. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, Easton, v. 53, n. 6, p. 1841-1856, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Câncer matou 8,2 milhões de pessoas em 2012, diz OMS**. Disponível em:
<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/agencianoticias/site/home/noticias/2013/caner_matou_8,2_milhoes_diz_oms>. Acesso em: 30 jun. 2015.

JACOBOWSKI, A. C. **Avaliação do potencial efeito genotóxico de quelato de cobre nano e microencapsulado**. 2009. 91 p. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade Católica “Dom Bosco”, Campo Grande, 2009.

KAKLAMANI, V. G.; GRADISHAR, W. J. Epirubicin versus doxorubicin: which is the anthracycline of choice for the treatment of breast cancer? **Clinical Breast Cancer**, New York, v. 4, n. 1, p. S26-S33, Apr. 2003. Supplement.

KASHYAP, M. K. et al. Different antioxidant status, total antioxidant power and free radical in essential hypertension. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 277, n. 1/2, p. 89-99, Sept. 2005.

KOLEVA, I. I. et al. Screening of plant extracts for antioxidant activity: a comparative study on three testing methods. **Phytochemistry Analytic**, New York, v. 13, n. 1, p. 8-17, Jan./Feb. 2002.

KUSKOSKI, E. M. et al. Aplicación de diversos métodos químicos para determinar actividad antioxidant em pulpa de frutos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 25, n. 4, p. 726-732, out./dez. 2005.

LARANJEIRA, L. L. S. et al. Localização de lesões tumorais induzidas pela 1,2-dimetilhidrazina e seu grau de atipia no cólon de ratos. **Acta Cirúrgica Brasileira**, São Paulo, v. 13, n. 3, jul./set. 1998. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86501998000300008>. Acesso em: 10 nov. 2014.

LEDERMAN, I. E. et al. **Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes)**. Jaboticabal: Ed. São Paulo, 2000. 35 p. (Série Frutas Nativas, 2).

LEHNINGER, A. L.; NELSON, D. L. E.; COX, M. M. **Princípios de bioquímica**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 1995. 839 p.

LEONG, L. P.; SHUI, G. An investigation of antioxidant capacity of fruits in Singapore markets. **Food Chemistry**, London, v. 76, n. 1, p. 69-75, Jan. 2002.

LEVI, E. et al. Combination of aging and dimethylhydrazine treatment causes an increase in cancer-stem cell population of rat colonic crypts. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, Orlando, v. 385, n. 3, p. 430-433, July 2009.

LEWIN, B. **Genes VII**. Porto Alegre: Artmed, 2001. 990 p.

LIANDA, R. L. P. **Perfil de substâncias fenólicas de méis brasileiros por cromatografia líquida de alta eficiência e avaliação do potencial antioxidante**. 2009. 185 p. Tese (Doutorado em Química) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, 2009.

MAFRA, D.; ABDALLA, D. S. P.; COZZOLINO, S. M. F. Peroxidação lipídica em pacientes com insuficiência renal crônica. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 12, n. 3, p. 205-212, set./dez. 1999.

MAIA, G. A. et al. Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n. 1, p. 130-134, jan./mar. 2007.

MALTA, L. G. et al. In vivo analysis of antigenotoxic and antimutagenic properties of two Brazilian Cerrado fruits and the identification of phenolic phytochemicals. **Food Research International**, Barking, v. 49, n. 1, p. 604-611, Nov. 2012.

MANELA-AZULAY, M. et al. Vitamina C. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro, v. 78, n. 3, p. 265-274, maio/jun. 2003.

- MARINHO, D. G. et al. The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 135, n. 2, p. 530-537, May 2011.
- MARTINS, B. A. **Avaliação físico-química de frutos do cerrado *in natura* e processados para a elaboração de multimisturas**. 2006. 85 p. Dissertação (Mestrado em Ecologia) - Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2006.
- MONTEIRO, J. M. et al. Taninos: uma abordagem da química à ecologia. **Química Nova**, São Paulo, v. 28, n. 5, p. 892-896, set./out. 2005.
- MORAES, T. de M. et al. *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 120, n. 2, p. 161-168, Nov. 2008.
- MOREIRA, R. R. D. et al. Avaliação da atividade mutagênica do extrato etanólico bruto de *Paepalanthus latipes* (Eriocaulaceae) e dos compostos flavonídeos 7-metoxilados relacionados. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 12, n. 1, p. 11-19, 2002.
- NACZK, M.; SHAHIDI, F. Extraction and analysis of phenolics in food. **Journal of Chromatography A**, Amsterdam, v. 1054, n. 1/2, p. 95-111, Oct. 2004.
- NIKI, E. Antioxidant activity: are we measuring it correctly? **Nutrition**, London, v. 16, n. 6, p. 524-525, Dec. 2002.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Fontes vegetais naturais de antioxidantes. **Química Nova**, São Paulo, v. 32, n. 3, p. 689-702, 2009.
- PARRON, M. L. et al. **Cerrado**: desafios e oportunidades para o desenvolvimento sustentável. Planaltina: EMBRAPA Cerrados, 2008. 464 p.
- PIENIZ, S. et al. Avaliação *in vitro* do potencial antioxidante de frutas e hortaliças. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 33, n. 2, p. 552-559, mar./abr. 2009.
- PITOT, H. C. The molecular biology of carcinogenesis. **Cancer**, Bruxelles, v. 72, n. 3, p. 962-970, Aug. 1993. Supplement.
- PITOT, H. C. The terminal stage in carcinogenesis. **Cancer Research**, Baltimore, v. 80, p. 599-607, 1989.

PITOT, H. C.; DRAGAN, Y. P. Chemical carcinogenesis. In: KLAASSEN, C. D. (Ed.). **Casarett & Doull's toxicology the basic science of Poisons**. New York: McGraw-Hill, 2001. p. 241-319.

POMPELLA, A. Biochemistry and histochemistry of oxidant stress and lipid peroxidation. **International Journal of Vitamin and Nutrition Research**, Bern, v. 67, n. 5, p. 289-297, 1997.

POTT, A.; POTT, V. J. **Plantas do pantanal**. Planaltina: EMBRAPA, 1994. 320 p.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R. et al. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 90, n. 4, p. 494-507, Apr. 2001.

QUEIROZ, Y. S. **Alho (*Allium sativum*) e produtos: atividade antioxidante in vitro durante a vida de prateleira**. 2006. 128 p. Dissertação (Mestrado em Saúde Pública) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

RAMEL, C. General environmental modifiers of carcinogenesis. **Acta Pharmacological Toxicology**, Oxford, v. 5, n. 2, p. 181-196, 1984.

RAMEL, C. Inhibitors of mutagenesis and their relevance to carcinogenesis. In: _____. **Antimutagenesis and anticarcinogenesis mechanisms**. New York: Springer, 1986. p. 511-517.

RAMFUL, D. et al. Polyphenol composition, vitamina C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. **Food Research International**, Barking, v. 44, n. 7, p. 2088-2099, Aug. 2011.

RANGANATH, R. M.; NAGASHREE, N. R. Role of programmed cell death in development. **International Review of Cytology**, New York, v. 202, p. 159-242, 2001.

REIS, S. R. D. A. et al. Avaliação da presença de micronúcleos em células esfoliadas da língua de indivíduos dependentes químicos de etanol através dos métodos de Feulgen e Papanicolau. **Revista Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 19, n. 46, p. 367-371, 2004.

RIBEIRO, J. C. et al. Evaluation of the genotoxic and antigenotoxic effects after acute and subacute treatments with acai pulp (*Euterpe oleracea* Mart.) on mice using the erythrocytes micronucleus test and the comet assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 695, n. 1/2, p. 22-28, Jan. 2010.

RIBEIRO, J. F.; WALTER, B. M. T. Fitofisionomias do bioma Cerrado. In: SANO, S. M.; ALMEIDA, S. P. (Ed.). **Cerrado: ambiente e flora**. Planaltina: EMBRAPA-CPAC, 1998. p. 89-166.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese ambiental**. Brasília: ULBRA, 2003. 198 p.

RIBEIRO, S. S. et al. Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. **Planta Medica**, Stuttgart, v. 78, n. 14, p. 1601-1606, Sept. 2012.

RIOS, A. O.; ANTUNES, L. M. G.; BIANCHI, M. L. P. Proteção de carotenóides contra radicais livres gerados no tratamento de câncer com cisplatina. **Alimentos e Nutrição**, Araraquara, v. 20, n. 2, p. 343-350, jan./mar. 2009.

RODRIGUES, V. E. G.; CARVALHO, D. A. Levantamento etnobotânico de plantas medicinais no domínio dos cerrados na região do Alto Rio Grande, Minas Gerais. **Ciência e Agrotecnologia**, Lavras, v. 25, n. 1, p. 102-123, jan./fev. 2001.

ROQUE, P. **A colonização do cerrado: savanas e celeiro do mundo**. São Paulo: Prêmio, 2006. 203 p.

ROSS, J. A.; KASUM, C. M. Dietary flavonoids: bioavailability, metabolic effects and safety. **Annual Review of Nutrition**, Palo Alto, v. 22, p. 19-34, July 2002.

ROTHFUSS, A. et al. Improvement of in vivo genotoxicity assessment: combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 723, n. 2, p. 108-120, 2011.

RUEFF, J. et al. DNA strand breaks and chromosomal aberrations induced by H₂O₂ and ⁶⁰Co γ -radiation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 289, n. 2, p. 197-204, Oct. 1993.

RUFINO, M. S. M. et al. Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-tradicional tropical fruits from Brazil. **Food Chemistry**, Oxford, v. 121, p. 996-1002, 2010.

RUFINO, M. S. M. et al. Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH• system. **Food Chemistry**, Oxford, v. 114, p. 693-695, 2009.

SALUNKHE, D. K.; BOLIN, H. R.; REDDY, N. R. **Storage, processing and nutritional quality of fruits and vegetables**. 2nd ed. Boca Raton: CRC, 1991. 520 p.

SANO, E. E. et al. Mapeamento semidetalhado do uso da terra do Bioma Cerrado. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, Brasília, v. 43, n. 1, p. 654-653, jan. 2008.

SANTOS, A. R. F. et al. Situação atual e perspectivas para o cultivo da mangaba no Estado de Sergipe. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE SISTEMAS DE PRODUÇÃO, 7., 2007, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: Sociedade Brasileira de Sistemas de Produção, 2007. p. 1-6.

SANTOS, M. A. dos. **O cerrado brasileiro: notas para estudo**. Belo Horizonte: UFMG/Cedeplar, 2010. 15 p. (Texto para Discussão, 387).

SERRA, C. P. et al. Validation of a colorimetric assay for the in vitro screening of inhibitors of angiotensin-converting enzyme (ACE) from plant extracts. **Phytomedicine**, Jena, v. 12, n. 6, p. 424-432, 2005.

SHAMI, N. J. I.; MOREIRA, E. A. M. Licopeno como agente antioxidante. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 17, n. 2, p. 227-236, mar./abr. 2004.

SHETYE, J. D. et al. Tumor-associated antigens common to humans and chemically induced colonic tumors of the rat. **Cancer Research**, Baltimore, v. 50, n. 19, p. 6358-6363, Oct. 1990.

SIES, H. Ebselen, a selenoorganic compound as glutathione peroxidase mimic. **Free Radical Biology and Medicine**, New York, v. 14, n. 3, p. 313-323, 1993.

SILVA, G. C. et al. *Hancornia speciosa* Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v. 137, n. 1, p. 709-713, 2011.

SILVA, J. P. L. et al. Organically produced coffee exerts protective effects against the micronuclei induction by mutagens in mouse gut and bone marrow. **Food Research International**, Barking, v. 61, p. 272-278, July 2014.

SILVA, P. A. et al. Desenvolvimento de metodologia analítica para determinação de vitamina C em morango por HPLC. In: REUNIÃO ANUAL DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE QUÍMICA, 32., 2009, Fortaleza. **Anais...** Fortaleza: SBQ, 2009. 1 CD-ROM.

SILVA JÚNIOR, J. F. A cultura da mangaba. **Revista Brasileira de Fruticultura**, Jaboticabal, v. 26, n. 1, abr. 2004. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0100-29452004000100001&script=sci_arttext>. Acesso em: 10 nov. 2014.

SINGAL, P. K. et al. Adriamycin-induced heart failure: mechanism and modulation. **Molecular Cell Biochemistry**, New York, v. 207, n. 2, p. 77-86, 2000.

SNYDER, R. D.; GREEN, J. W. A review of the genotoxicity of marketed pharmaceuticals. **Mutation Research Reviews in Mutation**, Amsterdam, v. 488, n. 2, p. 151-169, May 2001.

SOARES, D. G.; ANDREAZZA, A. C.; SALVADOR, M. Avaliação de compostos com atividade antioxidante em células da levedura *Saccharomyces cerevisiae*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 41, n. 1, p. 95-100, jan./mar. 2005.

SOARES, F. P. et al. Cultura da mangabeira (*Hancornia speciosa* Gomes). **Boletim Agropecuário**, Lavras, n. 67, p. 1-12, 2006.

SOUSA, C. S. et al. Mangaba: perspectivas e potencialidades. **Bahia Agrícola**, Salvador, v. 7, n. 1, p. 29-31, set. 2005.

TAIZ, L.; ZEIGER, E. **Fisiologia vegetal**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2009. 819 p.

TAO, K. et al. The multifaceted mechanisms for coffee's anti-tumorigenic effect on liver. **Medical Hypotheses**, New York, v. 71, n. 5, p. 730-736, Nov. 2008.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J. Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchange and cancer risk assessment. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 365, n. 1/3, p. 147-159, Sept. 1996.

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

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, The Hague, v. 266, n. 1/2, p. 37-56, Nov. 2004.

VIEIRA NETO, R. D. et al. **Sistema de produção de mangaba para os tabuleiros costeiros e baixada litorânea**. Aracaju: EMBRAPA Tabuleiros Costeiros, 2002. 22 p. (Sistemas de Produção, 2).

VRATIMOS, M. O.; BRANDAO, P. H.; SILVA, R. M. G. Investigação do efeito do látex de *Hancornia speciosa* no desenvolvimento, ingestão de água, alimentos e o ganho de peso na nutrição experimental de camundongos. In: SIMPÓSIO DE PLANTAS MEDICINAIS DO BRASIL, 19., 2006, Salvador. **Anais...** Salvador: UFBA, 2006. 1 CD-ROM.

WATTENBERG, L. W. Inhibition of neoplasia by minor dietary constituents. **Cancer Research**, v. 43, n. 5, p. 2448s-2453s, 1983. Supplement.

WEISS, R. B. The anthracyclines: will we ever find a better doxorubicin? **Seminars in Oncology**, Philadelphia, v. 19, n. 6, p. 670-686, Dec. 1992.

WOLFE, K. L.; LIU, R. H. Structure: activity relationships of flavonoids in the cellular antioxidant activity assay. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Washington, v. 56, n. 18, p. 8404-8411, Aug. 2008.

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

YU, T. W.; ANDERSON, D. Ractive oxygen species induced DNA damage and its modification: a chemical investigation. **Mutation Research**, Amsterdam, v. 379, n. 2, p. 201-210, 1997.

YUSPA, S. H.; HENNINGS, H.; LICHTI, U. Initiator and promoter induced specific changes in epidermal function and biological potential. **Journal of Supramolecular Structure and Cellular Biochemistry**, Redmond, v. 17, n. 3, p. 245-257, 1981.

ZAHA, A.; FERREIRA, H. B.; PASSAGLIA, L. M. **Biologia molecular básica**. 5. ed. Porto Alegre: Artmed, 2014. 336 p.

ZIEGLER, U.; GROSCURTH, P. Morphological features of cell death. **Physiology**, Bethesda, v. 19, n. 3, p. 124-128, 2004.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO 1****FIRST EVALUATION OF THE ANTIMUTAGENIC EFFECT OF
MANGABA FRUIT *IN VIVO* AND ITS PHENOLIC PROFILE
IDENTIFICATION**

Versão Aceita no formato da Revista Food Research International

LIMA, J. P.; AZEVEDO, L.; SOUZA, N. J.; NUNES, E. E.; VILAS BOAS, E. V. B. First evaluation of the antimutagenic effect of mangaba fruit in vivo and its phenolic profile identification. **Food Research International**. Volume 75, September 2015, Pages 216–224. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.05.045>

**FIRST EVALUATION OF THE ANTIMUTAGENIC EFFECT OF
MANGABA FRUIT *IN VIVO* AND ITS PHENOLIC PROFILE
IDENTIFICATION**

Juliana Pinto de Lima^a, Luciana Azevedo^{b*}, Nádia Janaína de Souza^b, Elisangela
Elena Nunes^a, Eduardo Valério de Barros Vilas Boas^a

^a UFLA – MG, Lavras Federal University, Department of Food Science,
POBOX 3037 Lavras, Minas Gerais, Brazil

^b UNIFAL – MG, Alfenas Federal University, Nutrition Faculty, 700 Gabriel
Monteiro da Silva St, Alfenas, MG 37130-000, Brazil

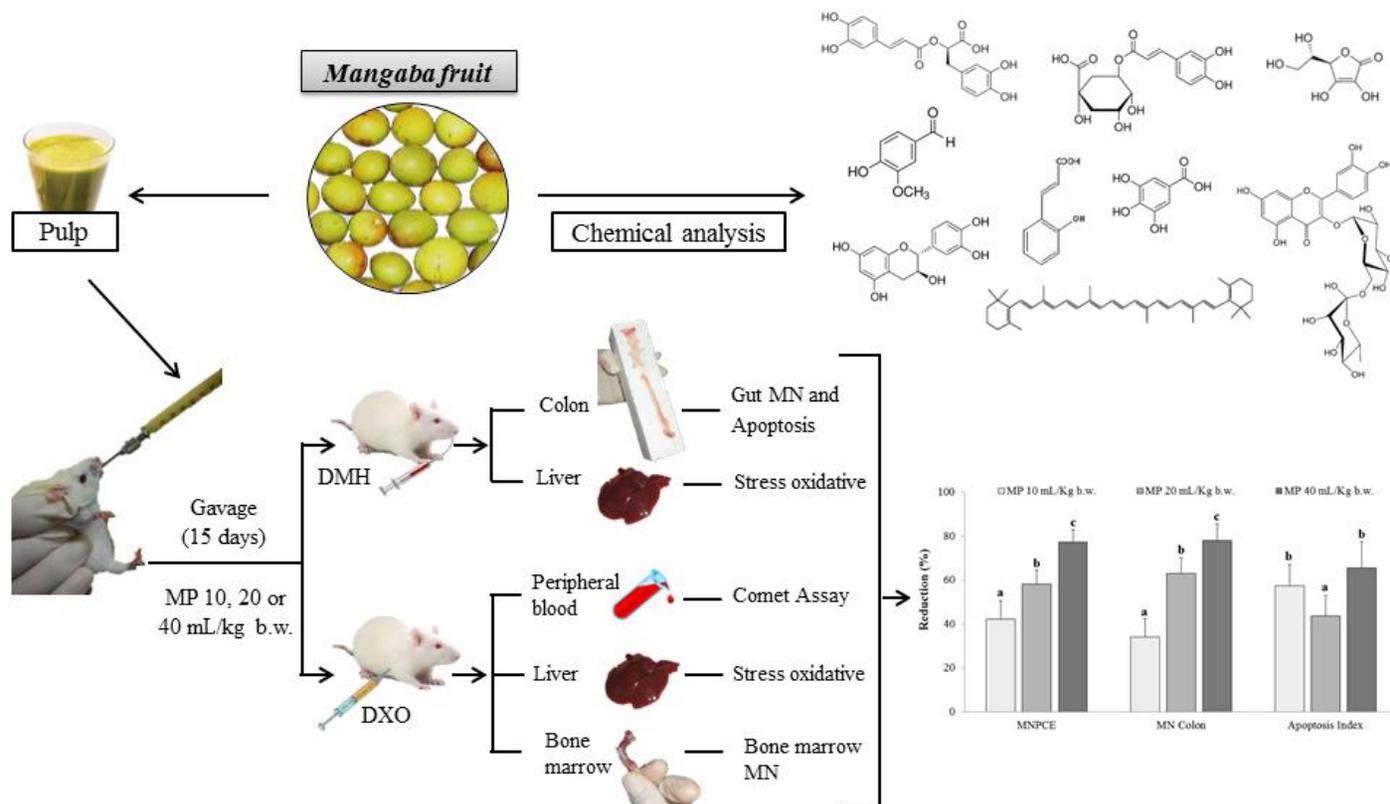
* Corresponding author. Tel.: +55 35 3299 1110; fax: +55 35 3299 1000

E-mail address: luciana.azevedo@unifal-mg.edu.br (L. Azevedo)

Abstract: The chemical composition and functional effects of mangaba fruit pulp were evaluated through a multi-endpoint assay in mice, consisting of the bone marrow micronucleus test, gut micronucleus test, and the apoptosis, oxidative stress, and comet assays. Mangaba fruit pulp was administered in three doses, 10, 20, and 40 ml/kg body weight (b.w.), by gavage to male Swiss mice against doxorubicin and dimethylhydrazine-induced mutagenicity. The phenolic profile of the mangaba fruit pulp was evaluated by HPLC, and seven compounds were identified: gallic acid, catechin, chlorogenic acid, vanillic acid, *o*-coumaric acid, rosmarinic acid, and rutin. The *in vivo* tests revealed that mangaba fruit pulp showed no toxic/mutagenic effects in any of the assays performed, and also showed protective effects at all endpoints. At the three administered extract concentrations, the main results about the protective effects were as follows: bone marrow micronucleus test (42.33, 58.14, and 77.21%), micronucleus gut test (34.21, 63.15, and 78.07%), and apoptosis index (57.5, 43.68, and 65.52%).

This study provides scientific evidence for the antimutagenic potential of mangaba fruit pulp and emphasizes its potential as a functional food with widespread applicability in the food industry.

Keywords: *Hancornia speciosa* Gomes; antimutagenicity; doxorubicin; dimethylhydrazine; micronucleus test; phenolic compounds.



Description: The graphical abstract of the study with mangaba fruit pulp. Effects of pulp mangaba fruit against DXR and DMH induction *in vivo*. MP: mangaba pulp; DXR: doxorubicin; DMH: 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride; MN: micronuclei

1 Introduction

Tropical countries produce a large number of native and exotic fruit species, which are of interest to the food industry. Exotic fruits, consumed regionally are gaining popularity in the marketplace owing to not only their pleasant flavors, but also their nutritional and therapeutic value (Costa, Garcia-Diaz, Jimenez, & Silva, 2013). Among these fruits, the *Hancornia speciosa* Gomes (Apocynaceae), popularly named “mangaba”, which in the native language means “thing good for eating”, is a plant species found among savannah-like vegetation in Brazil (Ferreira, Serra, Lemos, Braga, & Cortes, 2007). The fruit remains unexplored in spite of its great potential and interest to the agroindustry, with versatility in products such as ice cream, cookies, syrup, juice, wine, liquor, jelly, fruit compotes, alcohol, and vinegar (Clerici & Carvalho-Silva, 2011; Moraes et al., 2008). Nonetheless, in the regions of production, this fruit is highly sought after in marketplace causing its prices to be higher than that of grapes and other noble fruit (Lederman, Silva Júnior, Bezerra & Espíndola, 2000). The fruit itself is very aromatic, soft, and sweet, with a viscous flesh and an acidic pulp. Furthermore, it has a striking and variable shape, a small form, and is generally ellipsoidal or rounded, weighing around 25 g. The exocarp is yellow/green, and with or without red pigmentation (Barros et al., 2006; Clerici & Carvalho-Silva, 2011).

The mangaba fruit has a high phenolic content, 169 mg GAE/100 g fresh weight (f.w.) (Rufino et al., 2010) and 172 mg GAE/100 g f.w. (Rufino, Fernandes, Alves, & de Brito, 2009) according to literature, although to the best of our knowledge, this is the first study to quantify the phenolic compounds from mangaba fruit of the savannah-like vegetation found in Minas Gerais, Brazil. Additionally, this fruit is a source of ascorbic acid, 96.3 mg/100 g f.w. (Almeida et al., 2011) and other essential elements in the diet such as calcium,

zinc, iron (Silva, Lacerda, Santos, & Martins, 2008), carotenoids (Rufino et al., 2010) such as β -carotene, β -cryptoxanthin, besides α -tocopherol and α -, β - and γ -tocotrienols (Cardoso, Reis, Oliveira & Pinheiro-Sant'ana, 2014)

Although the medicinal applications of the mangaba plant have long been established, most studies focus the mangaba tree, i.e. bark, leaves, roots, and latex, with a lack about the fruit potential. In folk medicine, its bark is used as an infusion for the treatment of hypertension, stomach disturbances, and inflammatory diseases (Almeida et al., 1998), and its roots and leaves have been employed to treat rheumatism and hypertension (Hirschmann & Arias, 1990). Moreover, the latex is used to treat diseases related to fungal infection, tuberculosis, ulcers, hepatic function, acne, and warts (Pott & Pott, 1994). Scientific literature cites that the ethanolic extract of leaves has vasodilatory (Ferreira et al., 2007) and anti-hypertensive properties (Silva et al., 2011). The hydroalcoholic extract of the bark resulted in an increase in gastric mucus formation, antiulcer action, and anti-*Helicobacter pylori* activity, with the absence of toxicological effects (Moraes et al., 2008). Ribeiro et al. (2012) investigating the potential of extract hexane-metanolic from bark, leaves, latex and fruit against specific tumors *in vitro* (colon carcinoma, melanoma, glioblastoma and leukemia promielocitic), reported that *H. speciosa* would not be active. Moreover, Marinho, Alviano, Matheus, Alviano & Fernandes (2011) describe the anti-inflammatory effects of the latex through the inhibition of nitric oxide, PGE₂, and cytokine production. Assumpção et al. (2014) observed cytotoxic potential of ethanolic extract of mangaba fruit against the microcrustacean *Artemia salina*.

However, so far, there is no study reporting the mutagenic and anti-mutagenic effects of *in natura* mangaba fruit pulp. Since the fruits are normally consumed *in natura* or their pulp is used to make juice and other products, it is fundamental to evaluate their safety for human consumption and their possible

protective effect using mutagenic/antimutagenic assays. The combination of these tests has been generally used in genotoxicity studies due to the possibility of using various target organs in the same animal as well as the feasibility of evaluating different genetic endpoints (Rothfuss et al., 2011).

The presence of ascorbic acid and the secondary metabolites, such as phenolic compounds and/or carotenoids, can be related to the main effects of mangaba fruit. However, many studies must be carried out to make sure which compounds are responsible for the possible beneficial effects to health. There are many ways to check the functional potential of fruit and one of them is to evaluate if the ingestion of the pulp may, or not, promote beneficial effects in animals. So, this investigation was based on how the general population consumes this fruit (pulp *in natura*), instead of purified extracts. In light of the obtained results, new tests may be performed using extracts or active principles from the fruit.

Therefore, our research evaluated the chemical composition and functional effects of mangaba fruit pulp through a multi-endpoint assay in mice, combining the bone marrow micronucleus test, gut micronucleus test, and the apoptosis, oxidative stress and comet assay.

2. Material and methods

2.1 Plant material and experiment

The mangaba fruit (*H. speciosa*) used in the experiment (20 kg, about 500 fruits) was harvested from different trees at the characteristic area of Cerrado (savannah-like vegetation) in Curvelo Town, Minas Gerais State, Brazil (latitude 18° 45' 23" S, longitude 44° 25' 51" W and altitude 632 m). Mangaba fruits were harvested directly from the tree. The fruits were transported in

polystyrene boxes, from the field to the laboratory, within 24h after harvest. Just perfect morphologically and completely mature fruit were selected. The fresh fruit was washed, the seeds removed, and the pulp separated. The homogeneous mass of pulp and peel (edible parts of the fruit) was obtained and immediately frozen in liquid nitrogen. The frozen pulp was stored at -18 °C until use.

2.2 Chemical analysis

Three repetitions, consisting of 100 g each one, were performed for all chemical analyses. The values of the titratable acidity, soluble solids, pH, moisture, ash, proteins, lipids, and carbohydrates were determined (AOAC, 1998). Mineral analyses (calcium, iron, potassium, phosphorus, magnesium, copper, and zinc) were performed by the ash mineralization method and quantified using Inductively Coupled Plasma - Atomic Emission Spectrometry (ICP-AES).

The ascorbic acid of the mangaba fruit pulp (5 g) was extracted using 50 ml of ultrapure water. The samples were vortexed and placed in an ultrasonic bath at room temperature for 20 min. The extracts were obtained after centrifugation at $1400 \times g$ for 15 min and then filtered through a paper filter (pore diameter 14 μm). Ascorbic acid was analyzed using a high-performance liquid chromatography system (HPLC) (Shimadzu, SCL 20AD) comprising a high-pressure pump an autosampler with a loop of 20 μL and a diode array detector (DAD), adjusted to 250 nm for ascorbic acid. The reverse phase C18 column (250 x 4.6 mm, 3 μm) and a precolumn with the same phase were used for chromatographic separation. The mobile phase used for separation of aqueous acid was 0.01 M KH_2PO_4 with pH adjusted to 2.8 with phosphoric acid at a flow rate of 1.0 ml / min. Identification was performed comparing to retention times with authentic standard. Prior to injection, all samples were

filtered through a 0.22 μm pore size membrane filter (Millipore Corp., Bedford, MA). The results were expressed as mg of ascorbic acid/100 g f.w.

Carotenoids were extracted and quantified according to the method proposed by Rodrigues-Amaya (2001). The samples were analyzed using a spectrophotometer, and the results were expressed in mg β -carotene/100 g f.w.

The antioxidant and total phenolic extracts were obtained according to the method described by Larrauri, Rupérez, & Saura-Calixto (1997). Briefly, 5 g samples were weighed in centrifuge tubes and extracted sequentially with 40 ml of methanol/water (50:50, v/v) at room temperature for 1 h. The tubes were centrifuged at 25,400g for 15 min, and the supernatant was recovered. Then, 40 ml of acetone/water (70:30, v/v) were added to the residue at room temperature. The samples were extracted for 60 min and centrifuged. The methanol and acetone extracts were combined and brought to a final volume of 100 ml with distilled water.

The antioxidant capacity was expressed as the concentration of antioxidant required to reduce the original amount of free radicals by 50% (EC_{50}) and values expressed as g fruit/g DPPH. The total phenolic content was determined according to the adapted Folin–Ciocalteu method (Waterhouse, 2002), and the results were expressed as mg gallic acid equivalent (GAE)/100 g f.w.

Analysis of individual phenolic compounds was carried out using HPLC–DAD methods, described by Ramaiya, Bujang, Zakaria, King, & Sahrir (2013). Briefly, mangaba fruit pulp (5 g) was homogenized with 40 ml of solution containing 70% methanol–water (v/v). The samples were vortexed and placed in an ultrasonic bath at room temperature for 60 min. The extracts were obtained after centrifugation at $1400 \times g$ for 15 min and then filtered through a paper filter (pore diameter 14 μm). Prior to injection the samples were filtered through a 0.45 μm pore size membrane filter (Millipore Corp., Bedford, MA).

Chromatographic analyses were performed using a Shimadzu chromatograph (Shimadzu Corp., Kyoto, Japan) equipped with four high-pressure pumps (model LC-20AT), a diode array detector (model SPD-M20A), degasser (model DGU-20A5), CBM-20A interface, CTO-20AC oven, and autosampler (model SIL-20A). Separations were performed using a Ascentis C18 5 μm (250 mm \times 4 mm) column connected to a guard column (Ascentis C18, 4.0 \times 10 mm, 5 μm). The mobile phase consisted of 2% (v/v) acetic acid in water (mobile phase A) and methanol/water/acetic acid, 70:28:2 respectively, (mobile phase B) at a flow rate of 1.0 ml/min with 65 min run time and gradient elution program by the following linear gradient steps: start condition 100% A in 0-5 min, then 70% A in 5-25 min, 60% A in 25-43 min, 55% A in 43-50 min, 0% A in 50-55 min and 100% A in 55-65. The injection volume was 20 μL . Analyses were performed at 15°C. The phenolic compounds were detected at 280 and 330 nm. The phenolic compounds were identified by comparison of their retention times, UV-vis absorption spectra, and authentic standards (gallic acid, catechin, epicatechin, chlorogenic acid, caffeic acid, ferulic acid, *trans*-cinnamic acid, vanillic acid, rutin, quercetin, ellagic acid, rosmarinic acid, kaempferol, *m*-coumaric acid, *p*-coumaric acid, and *o*-coumaric acid).

2.3 Animals, experimental designs and growth performance

The animals used in this study were handled in accordance with the Ethical Principles for Animal Research adopted by the Brazilian College of Animal Experimentation (COBEA, protocol no. 417/2012). Male Swiss mice 4- to 5-weeks-old (25 ± 5 g b.w.), were used. They were fed ad libitum with a commercial pellet diet (Fri-lab Ratos II®) and water.

In order to assay the antimutagenic/mutagenic effect of mangaba fruit pulp in mice, an experiment was designed that involved administration of the drugs doxorubicin chloride (DXR) in experiment 1, and 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (DMH) in experiment 2, whose main target tissues are in the bone marrow (Antunes & Takahashi, 1998; Bhinge et al., 2012; Gibaud, Andreaux, Weingarten, Renard & Couvreur, 1994) and colon (Vanhouwaert, Vanparys & Kirsch-Volders, 2001; Weisburger, Reddy; Wynder, 1977; Fiala, 1977; Newell & Heddle, 2004), respectively.

The animals were divided into eight experimental groups and two control groups ($n = 8$ animals per group). In both experiments, group 1 mice (positive control) received drinking water plus the respective mutagenic drug. Group 5 mice (negative control) were treated with drinking water plus physiological saline solution (NaCl 0.9% *m/v*). Groups 2, 3, and 4 received mangaba fruit pulp administered orally in three doses (10, 20, or 40 mg/kg b.w., respectively) plus treatment with DXR (experiment 1) and DMH (experiment 2). Group 6 received only mangaba fruit pulp administered orally (40 mg/kg b.w.) plus physiological solution. The gavages were administered to animals twice a day. At doses of 10 and 20 mg/kg b.w., the first gavage was mangaba fruit pulp and the second one water, differently for groups that received the highest dose (40 mg/kg b.w.) the first and second gavages were with mangaba fruit pulp, in order to reach the high dose. The experiments were carried out for 15 days, and the drugs DXR (16 mg/kg b.w.) and DMH (30 mg/kg b.w.) were administrated at day 14. At the end of the study, all animals were anesthetized (ketamine and xylazine) and then euthanized by exsanguination. During necropsy, the bone marrow cells, liver, and peripheral blood were collected from the animals of experiment 1, and the liver and colon were removed from the animals of experiment 2. The body mass gain (BMG), specific growth rate (SGR), and feed conversion ratio (FCR) were calculated for each mice individually, by using

methods reported by Kumar, Akinleye, Makkar, Angulo-Escalante, and Becker (2011), and food efficiency rate (FER), according to Kalra & Jood (1998).

2.4 *In vivo* bone marrow MN test and comet assay

The micronucleus test was performed on bone marrow according to the protocol by Macgregor et al. (1987). Two-thousand polychromatic erythrocytes (PCE) were analyzed per mice on slides blindly scored using a light microscope at 1000× magnification (Venâncio, Silva, Almeida, Brigagão, & Azevedo, 2012).

The comet assay of the peripheral blood was performed, as described by Azevedo et al. (2007) and Tice et al. (2000) with some modifications; alkali denaturation (pH > 13) and electrophoresis were carried out for 20 min each. The fluorescent-labeled DNA was visualized using a NIKON ECLIPSE 80i fluorescence microscope at 400× magnification, with a green filter. The parameter selected for analysis was the comet tail intensity (i.e. the percentage of migrated DNA in the tail). Fifty cells were counted randomly from each slide, and a total of 100 cells were counted for each animal.

2.5 *In vivo* gut MN test and apoptosis

The colon was excised, flushed with 0.9% NaCl to remove fecal debris, cut open longitudinally, and rolled from caecum to anus. These “swiss rolls” were fixed in 10% (v/v) neutral formalin, embedded in paraffin and sectioned (5 µm). For the *in vivo* gut micronucleus test, the methods described by Vanhauwaert, Vanparys, & Kirsch-Volders (2001) were followed, with some modifications in coloring conditions. For each animal, 1000 colonic epithelial

cells and the total number of crypts analyzed were scored manually using a light microscope at 1000× magnification.

For the identification of apoptotic cells, a total of 20 perpendicular well-oriented crypts were examined in each animal, and the total number of epithelial cells were counted in each one (Chang, Chapkin, & Lupton, 1997). The apoptotic cells were identified as previously described by Risio et al. (1996). The apoptosis index (AI%) was estimated as the percentage of apoptotic cells in relation to the total number of cells.

2.6 Oxidative stress

The liver was homogenized with KCl 1.15% (w/v) and centrifuged, and the supernatant was used to determine lipid peroxidation (malonaldehyde – MDA) in accordance with Mihara & Uchiyama (1978). The protein content was quantified by the Bradford method (Bradford, 1976). The results were expressed as $\text{nmol mg} \times \text{protein}^{-1}$ (Mihara & Uchiyama, 1978).

2.7 Statistical analysis

All results of the chemical analyses (n=3) and in vivo tests (n=8) are presented as means \pm SD (standard deviation) of replications. Statistical analyses were performed using the program R Development Core Team software (R Development Core Team, 2010).

Evaluation of growth performance, and the oxidative stress and comet assay were performed using a one-way analysis of variance, followed by Scott-Knott's test. The frequencies of micronucleated and apoptotic cells were compared using the Chi square test. The level of significance was set at 5%. The

percentage of reduction in micronucleated and apoptotic cells, was calculated according to Azevedo et al. (2003).

3. Results and discussions

3.1 Composition of mangaba fruit

The studies concerning the composition of mangaba fruit pulp has revealed that its total protein concentration is 1.20 ± 0.06 g/100 g f.w., which is higher than other commonly consumed fruits, for example acerola fruit (0.9 g/100 g f.w.) (Vendramini & Trugo, 2000). The moisture content (82.45 ± 0.19 g/100 g f.w.) is similar to other fruits such as cherries 85.24 ± 2.52 g/100 g f.w. (Bastos et al., 2015), passion fruit pulp 84.1 ± 0.4 g/100 g f.w. (Genovese, Pinto, Goncalves, & Lajolo, 2008), and açaí, 84.1 ± 2.8 g/100 g f.w. (Rufino et al., 2010), however, the moisture content is less compared to strawberries, 92.68 ± 0.17 g/100 g f.w. (Souza et al., 2014) and acerola, 91.0 ± 0.2 g/100 g f.w. (Rufino et al., 2010). This fruit is a good source of carbohydrates (11.55 ± 0.27 g/100 g f.w.), with a concentration similar to that of blueberries (11.54 ± 0.13 g/100 g f.w.) and cherries (11.94 ± 0.28 g/100 g f.w.) (Souza et al., 2014). The lipid levels (2.29 ± 0.05 g/100 g f.w.) were found to be above what is considered normal in most fruit, for example red raspberries (0.28 ± 0.02 g/100 g f.w.), strawberries (0.25 ± 0.02 g/100 g f.w.) and blackberries (0.42 ± 0.05 g/100 g f.w.) (Souza et al., 2014). The ash concentration (0.36 ± 0.04 g/100 g f.w.) is similar to that of cherries (0.40 ± 0.10 g/100 g f.w.) (Bastos et al., 2015).

The mineral composition measurements were as follows: potassium 110 mg/100 g f.w., copper 0.41 mg/100 g f.w., zinc 2.18 mg/100 g f.w., and iron 2.21 mg/100 g f.w. Sulaiman et al. (2011) found that the iron and zinc content in different varieties of banana pulp ranged from 0.2-2.0 mg/100 g f.w. and 0.3-0.6

mg/100 g f.w., respectively. In this study, the iron and zinc content of mangaba fruit pulp was higher than certain varieties of bananas. Mangaba fruit may be considered an excellent source of potassium, exhibiting values higher than murici and jenipapo (103.05 and 92.55 mg/100 g f.w., respectively) (Souza, Pereira, Queiroz, Borges, & Carneiro, 2012), species also found in savannah-like vegetation occurring in Brazil.

With respect to chemical characteristics, mangaba fruit pulp presented a pH of 3.20 ± 0.02 , titratable acidity 1.06 ± 0.04 g citric acid/100 g f.w., and soluble solids $16.01 \pm 0.9\%$. The soluble solid content correlated with the levels of sugars and organic acids, and is an important feature of fresh products since consumers prefer fruits that are sweet (Silva, Sa, Mariguele, Barbosa, & Oliveira, 2002). Acidity is one of the criteria that affects the classification of fruit based on taste; fruit with levels of citric acid ranging from 0.08-1.95% can be classified as mild in flavor and are well accepted for consumption in the form of fresh fruit (Paiva, Manica, Fioravanço, & Kist, 1997).

Vitamin C is considered a major, naturally occurring nutrient and antioxidant required in the daily diet. Ramful, Tarnus, Aruoma, Bourdan & Bahorun (2011) classified fruits into three categories according to the ascorbic acid content: low (<30 mg/100 g), medium (30–50 mg/100 g), and high (>50 mg/100 g). Consequently, mangaba fruit (255.90 ± 34.89 mg/100 g) may be classified as having high ascorbic acid content. The ascorbic acid results were around three-fold higher than the ones showed by Almeida et al. (2011) (96.3 ± 1.7 mg/100 g f.w). Mangaba fruit also exhibited higher ascorbic acid content than other commercial fruits, such as strawberries (42.45 ± 4.78 mg/100 g f.w.), and pulp of açaí (68.5 mg/100 mL juice) (Cardoso, et al., 2011; Neves, et al., 2015). Taking into account that the Dietary Reference Intake (DRI) of ascorbic acid for adults is 75 mg/dia (IOM, 1999–2011), the consumption of 30 g mangaba fruit (around 1 fruit) is enough to fulfill this recommendation.

The total carotenoid content in mangaba fruit was found to be 0.69 ± 0.79 mg/100 g f.w., which is higher than that found by Rufino et al. (2010) (0.3 ± 0.05 mg/100 g f.w.). The total polyphenol content in the mangaba fruit was 352.98 ± 37.09 mg/100 g f.w., which is also higher than that reported by Rufino et al. (2010) (169 ± 21.5 mg GAE/100 g f.w.), Almeida et al. (2011) (98.8 ± 5.6 mg GAE/100 g f.w.) and Rufino, Fernandes, Alves e Brito (2009) (172 ± 31.1 mg GAE/100 g f.w.). The mangaba fruit phenolic content was high compared to apples (56.89 ± 1.42 mg GAE/100 g f.w.) and bananas (56.26 ± 1.35 mg GAE/100 g f.w.) (Chen et al., 2014). The difference observed in the bioactive compounds (ascorbic acid, carotenoids, and phenolic compounds) in mangaba fruit of study in comparison to the data from the literature, can be justified by the effect of several factors, such as the time of harvest, maturity, variety, weather and soil conditions, sun exposure, location of fruit on the plant, and post-harvest handling (Faniadis, Drogoudi, & Vasilakakis, 2010).

The phenolic profile of the mangaba fruit pulp indicated the presence of flavonoids (catechin and rutin) and non-flavonoids (gallic acid, chlorogenic acid, vanillic acid, *o*-coumaric acid, and rosmarinic acid) (Table 1 and Figure 1). Assumpção et al. (2014) through phytochemical screening also revealed a presence of phenols and flavonoids in the ethanolic extract of mangaba fruit. Our results also revealed a predominant presence of chlorogenic acid (18.091 ± 1.68 mg/100 g f.w.) and rutin (10.260 ± 1.13 mg/100 g f.w.) (Table 1). Gomes, Ramalho, & Gualberto (2013) also reported high concentrations of chlorogenic acid in mangaba fruit ($113.4 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$) while the Ferreira et al. (2007) analysis of an ethanol extract from *H. speciosa* leaves indicated rutin as a major constituent.

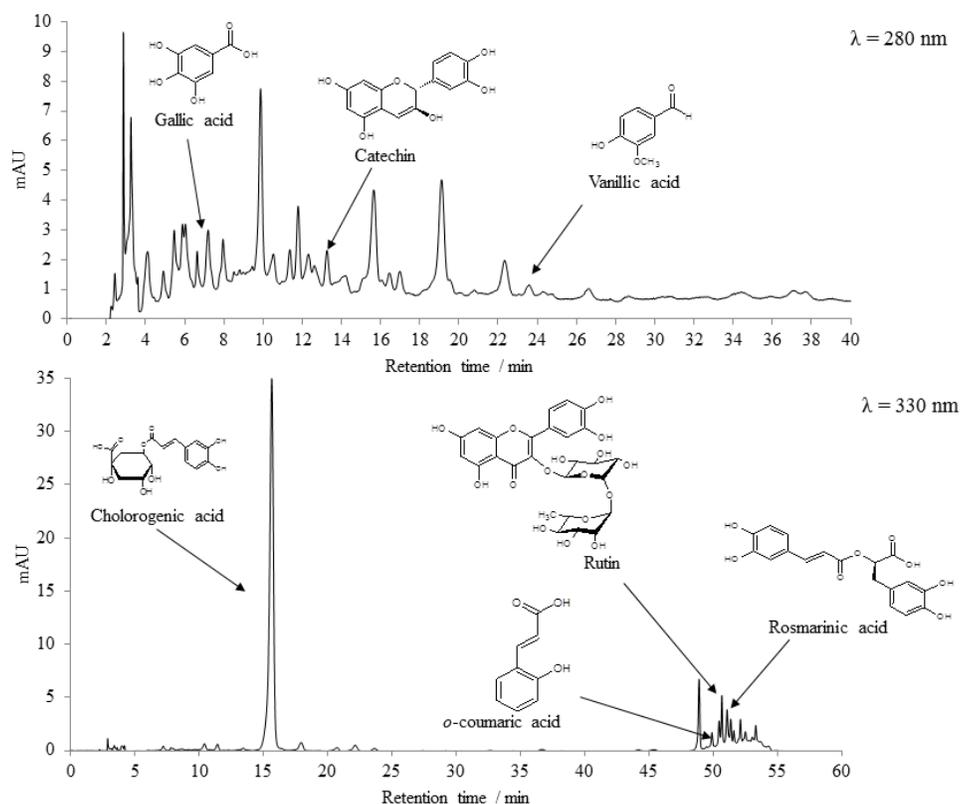
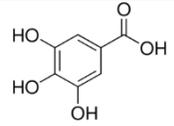
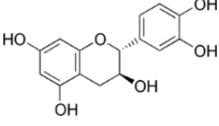
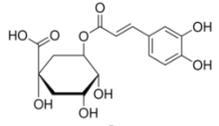
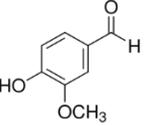
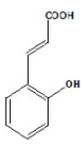
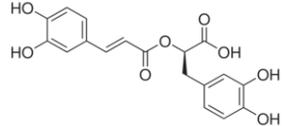
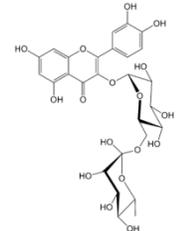


Figure 1 Description: HPLC separation of phenolic compounds from mangaba fruit pulp

Phenolic compounds have attracted increasing attention for their potential in preventing and treating many oxidative stress-related diseases (Chen et al., 2014, Kahkonen, Hopia & Heinonen, 2001; Robards, Prenzler, Tucker, Swatsitang & Glover, 1999; Valko, Rhodes, Moncola, Izakovic & Mazura, 2006; Zheng & Wang, 2003), and act as antimutagenic agents. Bioactive compounds present in mangaba fruit, such as ascorbic acid, carotenoids, and phenolic compounds, can interact synergistically with each other, resulting in higher antioxidant activity of the fruit than the activities of its individual components. Indeed, these antioxidant and antimutagenic effects were observed

in our study, where the pulp showed 489.53 ± 18.96 g fruit/g DPPH (EC_{50}) for the scavenging of free radicals, and will be explored further.

Table 1 Polyphenol compounds in aqueous-organic extracts of mangaba pulp measured in mg/100 g fresh weight of fruit

Compound	UV λ_{max} , nm	Chemical structure	Mangaba fruit pulp
Gallic acid	280		0.121 ± 0.08
Catechin	280		0.785 ± 0.12
Chlorogenic acid	330		18.091 ± 1.68
Vanillic acid	280		0.430 ± 0.05
<i>o</i> -coumaric acid	330		0.183 ± 0.07
Rosmarinic acid	330		0.129 ± 0.07
Rutin	330		10.260 ± 1.13

Mean value \pm standard deviation of fruit pulp weight; n = 3

3.2 *In vivo* bone marrow MN test, comet assay, *in vivo* gut MN test, gut apoptosis index, and oxidative stress assay

We found no difference related to the nutritional variables of growth performance among groups. The mean results for all experimental groups was as follows: initial body mass (28.24 ± 1.34 g), final body mass (38.66 ± 1.22 g), food consumption per day (6.18 ± 0.26 g), BMG (%) 27.58 ± 1.96 , SGR (% per day) 1.59 ± 0.09 , FCR 10.82 ± 0.54 , and FER 0.10 ± 0.01 . Changes on those variables related to components, foods and dosages, normally, suggest positive or negative effects on metabolism, even toxic ones. Our results about the nutritional profile indicate the absence of toxic effects and good acceptability of the extract of mangaba fruit, and there were no differences among experimental groups.

In spite of the belief that natural products are safe for human use, studies have shown that many plants are potentially toxic to human health and cause deleterious effects (Hernandes et al., 2014). The mangaba fruit showed no toxic/mutagenic effects in all assays performed. Moreover, we found significant increases in the positive control groups (G1 - DXR or DMH) for all parameters tested in comparison to the negative control group (G5) (Tables 2 and 3), confirming the sensitivity of the test.

Table 2 Effects of mangaba fruit pulp against doxorubicin in male Swiss mice in multi-endpoint assays

Groups	N	Treatments	Oxidative stress	Comet Assay	Bone marrow MN test			
			MDA (nmol mg×protein ⁻¹) (mean ± SD)	Tail Intensity (mean ± SD)	Cells	PCE/NCE	Total MNPCE	%MN
G1	08	DXR	7.14 ± 1.74 ^a	61198.00 ± 21488 ^a	16000	0.78	279*	1.70
G2	08	MP 10ml/Kg b.w.+DXR	4.86 ± 1.48 ^b	70172.17 ± 22332 ^a	16000	0.99	188	1.17
G3	07	MP 20ml/Kg b.w.+DXR	4.83 ± 1.23 ^b	35867.50 ± 8989 ^b	14000	1.04	154	1.10
G4	08	MP 40ml/Kg b.w.+DXR	4.40 ± 1.61 ^b	86717.25 ± 15030 ^a	16000	0.89	113	0.71
G5	08	PS	3.54 ± 0.83 ^b	34334.36 ± 12760 ^b	16000	1.32	64	0.40
G6	08	MP 40ml/Kg b.w + PS	4.30 ± 1.32 ^b	30384.00 ± 7995 ^b	16000	1.03	59	0.37

N: Number of animals; DXR: doxorubicin (16 mg/kg b.w.); PS: physiological solution (NaCl, 0.9% w/v); MP: mangaba fruit pulp; MDA: malonaldehyde; SD: standard deviation; PCE/NCE: polychromatic erythrocytes/normochromatic erythrocytes ratio; MNPCE: micronucleated polychromatic erythrocytes; MN: micronuclei; MDA and Tail intensity: means followed by the same letter do not differ by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). *MNPCE conclusions: G2, G3, G4 < G1 and G1 > G5 (Chi square test; $P < 0.05$)

Table 3 Effects of mangaba fruit pulp against dimethylhydrazine in male Swiss mice in multi-endpoint assays.

Groups	N	Treatments	Oxidative stress	Frequency of micronucleated gut epithelial cells				Frequency of apoptotic cells			
			MDA (nmol mg×protein ⁻¹) (mean ± SD)	Total cells	Total Crypts	Cells/c ryp	Total Micronucleated cells	% MN	Total Apoptotic cells	Total cells	AI%
G1	08	DMH	5.57 ± 1.39 ^a	7.000	146	47.95	136*	1.94	64*	974.29	0.94
G2	08	MP 10 ml/Kg b.w. + DMH	5.54 ± 1.09 ^a	7.000	132	53.03	97	1.39	27	883.29	0.44
G3	08	MP 20 ml/Kg b.w. + DMH	5.51 ± 0.96 ^a	7.000	138	50.72	64	0.91	38	964.14	0.56
G4	08	MP 40 ml/Kg b.w. + DMH	3.60 ± 0.32 ^b	7.000	132	53.03	47	0.67	28	952.38	0.37
G5	08	PS	3.54 ± 0.83 ^b	7.000	113	61.95	22	0.31	6	1086.50	0.07
G6	08	MP 40ml/Kg b.w. + PS	4.30 ± 1.32 ^b	8.000	143	55.94	26	0.33	2	1048.88	0.02

N: Number of animals; DMH: 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride (30 mg/kg b.w.); PS: physiological solution (NaCl, 0.9% w/v). MP: mangaba fruit pulp; MDA: malonaldehyde; SD: standard deviation; MN: micronucleated cells; AI: Apoptosis Index. MDA test: means followed by the same letter do not differ by the Scott-Knott test ($P < 0.05$). *MN Colon and apoptotic cell conclusions: G2, G3, G4 < G1 and G1 > G5 (Chi square test; $P < 0.05$)

Although the micronucleus (MN) test is most frequently used to evaluate bone marrow, this assay was carried out in gut epithelial cells because they are the first to come into contact with food compounds. Furthermore, gut epithelial cells are highly suitable for the MN evaluation owing to elevated cell turnover and the fact that this assay was able to detect both clastogenic and aneugenic effects in chemical compounds that are not detected by the bone marrow MN test (Vanhouwaert et al., 2001). The bone marrow MN test and gut MN test methods are complementary and showed similar responses. A reduction in micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) was observed with all three mangaba fruit pulp doses (42.33, 58.14, and 77.21%), and a reduction in the micronucleus gut test (34.21, 63.15, and 78.07%) was shown in relation to the respective controls (G1 — DXR or DMH) (Tables 2 and 3 and Figures 2A, 2B and 3). It indicates that the three doses of mangaba fruit showed protective effects as an antimutagenic food in bone marrow and the gut. Moreover, there were differences among these reductions that highlight the dose-dependent effect of the fruit.

Because the apoptosis is an important event in the eradication of cells that have undergone DNA insult due to mutagenic/genotoxic chemicals (Nowsheen & Yang, 2012); as a result, it was considered important to conduct this analysis. Interestingly, protective effects were observed in the gut apoptosis cells analysis for all doses of mangaba fruit, with a reduction in the apoptosis index ranging from 43.68-65.52% (Table 3 and figures 2C and 3), although a dose-response relationship was not detected. A decrease in this index indicates that mangaba fruit pulp protects against DNA damage, and therefore cell death mechanisms, such as apoptosis, do not occur.

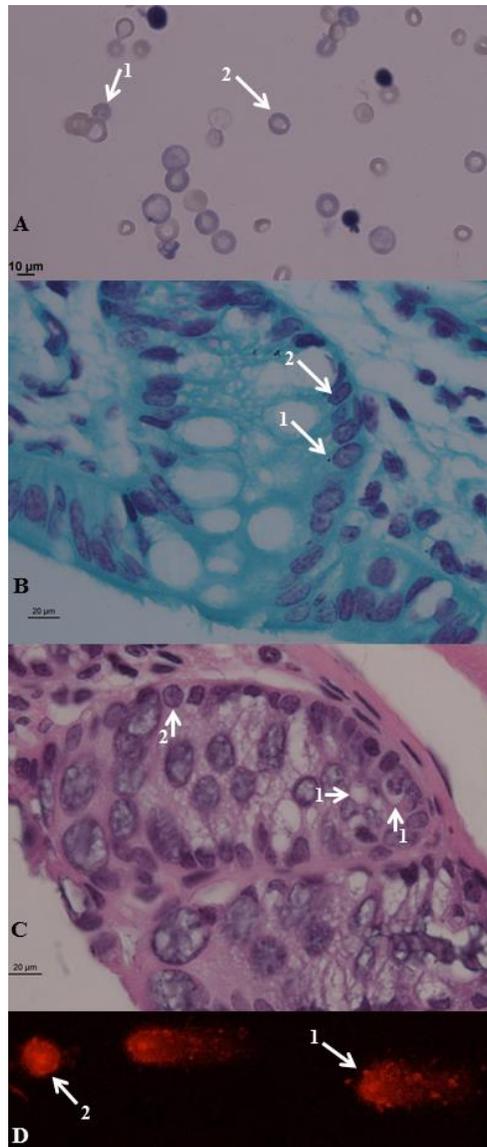


Figure 2 Description: Images of damage assessed in the bone marrow, gut and peripheral blood. Views of different types of damage identified in polychromatic erythrocyte and colonic epithelium 24 h after treatment with 1,2-dimethylhydrazine dihydrochloride - DMH and doxorubicin - DXR. (A) micronucleated PCE (arrow, 1000× objective), (B) micronucleated colonocytes (arrows, 1000×), (C) colonocytes in apoptosis (arrows, 1000×), (D) comet assay (arrows, 1000×). Different arrows indicate the damaged (1) and normal (2) structures

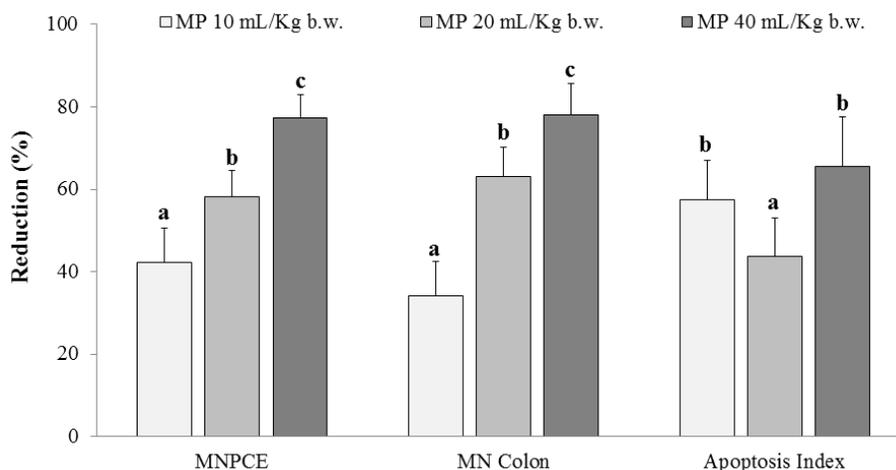


Figure 3 Description: The main results concerning the protective effects of mangaba obtained from the *in vivo* experiment. Micronuclei (MN) and apoptosis reduction (%) in groups treated with mangaba fruit pulp of 10, 20, and 40 ml/kg b.w. All of them were statistically significant ($P < 0.05$) when compared to the positive control. Means followed by the same letter do not differ by the Chi square test ($P < 0.05$)

The comet assay was employed in order to elucidate the mechanism of action of mangaba fruit pulp as a protective agent (Figure 2D). This test indicates that the treatment dose of 20 ml/kg b.w. promoted a significant decline in damage index, in spite of the absence of a protective effect at 10 and 40 ml/kg b.w. Although 20 ml/kg dosage has been effective in decreasing the damage index, 40 ml/kg dosage does not have the same effect. We could infer that compounds present in mangaba fruit, when in higher concentrations, as may have occurred with the 40 ml/kg dosage, they could nullify the protective effect obtained with the 20 ml/kg dosage. E.g. phenolic compounds, such as the excess of tannin, may promote adverse effects to metabolism.

Indeed some substances may, under certain conditions, induce damage effects depending on many factors. Some substances may at the same time stimulate or inhibit the detoxifying mechanisms and many anti-oxidants can,

depending on the redox potential, either accept or donate electrons, which may alternatively render them either protective or adverse (Lima, Azevedo, Ribeiro & Salvadori, 2003). This suggests that at 20 ml/kg b.w., mangaba fruit pulp may act by reducing the induction of DNA damage induced by DXR. Furthermore, it could also be due to an improvement in the repair system, as detected by the micronucleus test that assays all the events during cell division. In summary, the ability of mangaba fruit to protect against the effects of DXR and DMH could be attributed to various antioxidant compounds found in the fruit that may act synergistically, leading to a reduction in DNA insult in the daughter cells.

The clastogenic and aneugenic effects of DXR and DMH suggest that they may be involved in the production of reactive oxygen species (ROS). DXR may induce the production of ROS by its reduction leading to the formation of semiquinone free radicals, which react with molecular oxygen to produce a superoxide radical (Doroshov & Davies, 1986; Hernandez et al., 2014). They could also be produced by reactions with iron (Hernandez et al., 2014; Šimůnek et al., 2009) or superoxide radical production through NADPH oxidase activation (Gilleron et al., 2009; Hernandez et al., 2014). Additionally, DMH undergoes oxidative metabolism resulting in the production of an electrophilic diazonium ion, which is known to generate harmful ROS (Muthu & Vaiyapuri, 2013). One of the plausible reasons of protective effect of mangaba fruit pulp against ROS-mediated cell injury induced by DXR and DMH may be due to its phenolic compounds. In the chemical characterization, we point out that phenolic compounds are important mangaba fruit constituents (Table 1) and are recognized as potent antioxidants, having action mechanisms including the ability to scavenge free radicals, act as hydrogen donors, and chelate metals (Alonso & Gonzalo, 2002; Silva et al., 2012), which reduces the potential for DNA insults.

Specifically, the protective effect of mangaba fruit pulp can be linked to their key components, which are found in the phenolic fraction of the fruit. Catechin is a potential antioxidant and antimutagenic agent, and promotes abrogation of cytochrome P450 activation, thereby decreasing redox-mediated bioactivation of pro-carcinogens to carcinogenic free radicals (Ferrari & Torres, 2003). Chlorogenic acid is widely recognized for its antimutagenic and anticarcinogenic effects and as a scavenger for reactive species of oxygen and nitrogen. Sawa, Nakao, Akaike, Ono, & Maeda (1999) found chlorogenic acid to have very high alkyl peroxy radical (ROO•) scavenging activity, and compared to around 18 other antioxidant compounds, chlorogenic acid was second only to rutin. Both these substances were found in mangaba fruit pulp. Among the flavonoids, rutin is considered a potent antioxidant with a wide spectrum of applications (Marcarini et al., 2011). It is only slightly weaker than quercetin in antiradical activity (Kim, Kwon, & Jang, 2011). In addition, Endringer et al. (2010), observed *in vitro* cancer chemopreventive effects of leaves of the mangaba plant, whereas rutin, isolated from *H. speciosa* leaves, is possibly responsible for this effect.

Recalling the chemical analysis in this study, vitamin C was one of the major compounds isolated from mangaba fruit. This vitamin together with phenolic compounds may play an important role in the reduction of DNA damage induced by DXR and DMH via bio-antimutagenic, desmutagenic activity, competing with DNA as a target for alkylation, reducing the genotoxicity of alkylating agents (Franke, Prá, Erdtmann, Henriques, & Silva, 2005) and taking part in the regulation of DNA repair enzymes, scavenging of free radicals, and quenching of singlet oxygen (Breda, Kok, & Delft, 2008).

As mentioned above, DXR- or DMH-induced oxidative stress may be one of the mechanisms of its toxic actions. An important consequence of the excessive production of ROS by DXR and DMH is an increase in lipid

peroxidation (Hernandes et al., 2014), that results in cellular structure damage and has frequently been implicated in the initiation and promotion stages of pathogenesis of carcinogenesis (Muthu & Vaiyapuri, 2013). Therefore, the effects of mangaba fruit pulp on DMH- or DXR-induced malonaldehyde (MDA) content, a marker of lipid peroxidation, were investigated. Results concerning the mangaba fruit effect against DXR showed that irrespective of the concentration of mangaba fruit pulp in a diet, it reduced the MDA levels (Table 2). Additionally, assessing the effects of mangaba fruit versus DMH, the results showed a reduction in MDA levels at the dose of 40 mg/kg (Table 3). These results confirm the antioxidant power of mangaba fruit pulp, which contributes to its protective effects against oxidative stress induced by DXR and DMH.

Finally, since the mangaba fruit presents several substances with physiological and biochemical functions, and benefits health and/or reduces the risk of chronic disease, as showed by the *in vivo* tests, this fruit could be considered as a functional food as highlighted by Ferrari & Torres (2003) and Nobili et al. (2009).

4. Conclusions

The composition and characteristics of mangaba fruit pulp revealed high levels of phenolic compounds and ascorbic acid, which lead to high antioxidant activity. Chromatographic analyses showed seven phenolic compounds in mangaba fruit pulp: gallic acid, catechin, chlorogenic acid, vanillic acid, *o*-coumaric acid, rosmarinic acid, and rutin. Under the conditions tested herein, the mangaba fruit showed no toxic/mutagenic effects in any of the *in vivo* assays performed; moreover, protective effects were observed in the bone marrow MN test, *in vivo* gut MN test, comet assay, gut apoptosis cells and oxidative stress.

This study provides scientific evidences for the antimutagenic potential of mangaba fruit pulp and emphasizes its potential as a functional food with widespread applicability in the food industry. Additionally, further investigations to clarify the properties of the intake of mangaba fruit pulp are necessary to elucidate a possible anticancer role.

Acknowledgments

The authors acknowledge the financial support of CAPES, FAPEMIG, and CNPq.

5. References

- Almeida, M. M. B., Sousa, P. H. M., Arriaga, Â. M. C., Prado, G. M., Magalhães, C. E. D. C., Maia, G. A., & Lemos, T. L. G. (2011). Bioactive compounds and antioxidant activity of fresh exotic fruits from northeastern Brazil. *Food Research International*, *44*, 2155–2159. doi:10.1016/j.foodres.2011.03.051
- Almeida, S. P., Proença, C. E. B., Sano, S. M., & Ribeiro, J. F. (1998). *Cerrado: espécies vegetais úteis*. EMBRAPA, Planaltina, D.F, p. 38.
- Alonso, M. G., & Gonzalo, J. C. R. (2002). *Flavonoides en alimentos vegetales: estructura y actividad antioxidante*. *Alim. Nutr. Sal.* *9*, 31–38.
- Antunes, L. M. G., & Takahashi, C. S. (1998). Effects of high doses of vitamins C and E against doxorubicin-induced chromosomal damage in Wistar rat bone marrow cells. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, *419*, 137–143.
- AOAC — Association of Official Analytical Chemists (1998). *Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists*. (16th ed). Washington, D.C., vol. 2.
- Assumpção, C. F., Bachiega, P., Morzelle, M. C., Nelson, D. L., Ndiaye, E. A., Rios, A. O., & Souza, E. C. (2014). Characterization, antioxidant potential

and cytotoxic study of mangaba fruits. *Cienc. Rural*, *44*, 1297-1303.
<http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr2013085>.

- Azevedo, L., Lima, P. L. A., Gomes, J. C., Stringheta, P. C., Ribeiro, D. A., & Salvadori, D. M. F. (2007). Differential response related to genotoxicity between eggplant (*Solanum melanogena*) skin aqueous extract and its main purified anthocyanin (delphinidin) in vivo. *Food and Chemical Toxicology*, *45*, 852–858. doi:10.1016/j.fct.2006.11.004
- Azevedo, L., Gomes, J. C., Stringheta, P. C., Gontijo, Á. M. M. C., Padovani, C. R., Ribeiro, L. R., & Salvadori, D. M. F. (2003). Black bean (*Phaseolus vulgaris* L.) as a protective agent against DNA damage in mice. *Food and Chemical Toxicology*, *41*, 1671–1676. doi:10.1016/S0278-6915(03)00173-X
- Barros, D. I., Bruno, R. L. A., Nunes, H. V., Cabral, G., Silva, G. C., Pereira, W. E., & Mendonça, R. M. N. (2006). Different Extraction Methods Aiming Mangaba Seeds Quality. *Rev. Bras. Frutic.*, *28*, 25–27.
- Bastos, C., Barros, L., Calhella, R. C., João, M., Queiroz, R. P., Santos-Buelga, C., & Ferreira, I. C. F. R. (2015). Chemical characterisation and bioactive properties of *Prunus avium* L.: The widely studied fruits and the unexplored stems. *Food chemistry*, *173*, 1045–1053. doi:10.1016/j.foodchem.2014.10.145
- Bhingé, K. N., Gupta, V., Hosain, S. B., Satyanarayanaojis, S. D., Meyer, S. A., Blaylock, B., Zhang, Q. J., & Liu, Y. Y. (2012). The opposite effects of doxorubicin on bone marrow stem cells versus breast cancer stem cells depend on glucosylceramide synthase. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, *44*(11), 1770–1778.
- Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, *72*, 248–254. doi:10.1016/0003-2697(76)90527-3
- Breda, S. G. J., Kok, T. M. C. M., & Delft, J. H. M. (2008). Mechanisms of colorectal and lung cancer prevention by vegetables: a genomic approach. *Journal of Nutritional Biochemistry*, *19*, 139–157. doi:10.1016/j.jnutbio.2007.04.002

- Cardoso, M. C., Reis, B. L., Oliveira, D. S., & Pinheiro-Sant'ana, H. M. (2014). Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) from the Brazilian Cerrado: nutritional value, carotenoids and antioxidants vitamins. *Fruits*, *69*, p.89-99. doi:10.1051/fruits/2013105
- Cardoso, P. C., Tomazini, A. P. B., Stringheta, P. C., Ribeiro, S. M. R., & Pinheiro-Sant'Ana, H. M. (2011). Vitamin C and carotenoids in organic and conventional fruits grown in Brazil. *Food Chemistry*, *126*, 411–416.
- Chang, W. C. L., Chapkin, R. S., & Lupton, J. R. (1997). Predictive value of proliferation, differentiation and apoptosis as intermediate markers for colon tumorigenesis. *Carcinogenesis*, *18*(4), 721–730. doi:10.1093/carcin/18.4.721
- Chen, G.-L., Chen, S.-G., Zhao, Y.-Y., Luo, C.-X., Li, J., & Gao, Y.-Q. (2014). Total phenolic contents of 33 fruits and their antioxidant capacities before and after in vitro digestion. *Industrial Crops and Products*, *57*, 150–157. doi:10.1016/j.indcrop.2014.03.018
- Clerici, M. T. P. S., & Carvalho-Silva, L. B. (2011). Nutritional bioactive compounds and technological aspects of minor fruits grown in Brazil. *Food Research International*, *44*(7), 1658–1670. doi:10.1016/j.foodres.2011.04.020
- Costa, A. G. V., Garcia-Diaz, D. F., Jimenez, P., & Silva, P. I. (2013). Bioactive compounds and health benefits of exotic tropical red-black berries. *Journal of Functional Foods*, *5*, 539–549. doi:10.1016/j.jff.2013.01.029
- Doroshov, J. H., & Davies, K. J. A. (1986). Redox cycling of anthracyclines by cardiac mitochondria. II. Formation of superoxide anion, hydrogen peroxide, and hydroxyl radical. *Journal of Biological Chemistry*, *261*(7), 3068–3074.
- Endringer, D. C., Valadares, Y. M., Campana, P. R. V., Campos, J. J. Guimarães, K. G., Pezzuto, J. M., & Braga, F. (2010). Evaluation of Brazilian Plants on Cancer Chemoprevention Targets In Vitro. *Phytotherapy Research*, *24*, 928–933.
- Faniadis, D., Drogoudi, P. D., & Vasilakakis, M. (2010). Effects of cultivar, orchard elevation, and storage on fruit quality characters of sweet cherry

- (*Prunus avium* L.). *Scientia Horticulturae*, 125(3). 301–304.
doi:10.1016/j.scienta.2010.04.013
- Ferrari, C. K. B., & Torres, E. A. F. S. (2003). Biochemical pharmacology of functional foods and prevention of chronic diseases of aging. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 57, 251–260. doi:10.1016/S0753-3322(03)00032-5
- Ferreira, H. C., Serra, C. P., Endringer, D. C., Lemos, V. S., Braga, F. C., & Cortes, S. F. (2007). Endothelium-dependent vasodilation induced by *Hancornia speciosa* in rat superior mesenteric artery. *Phytomedicine*, 14, 473–478. doi:10.1016/j.phymed.2006.11.008
- Ferreira, H. C., Serra, C. P., Lemos, V. S., Braga, F. C., & Cortes, S. F. (2007). Nitric oxide-dependent vasodilatation by ethanolic extract of *Hancornia speciosa* via phosphatidyl-inositol 3-kinase. *Journal of Ethnopharmacology*, 109, 161–164. doi:10.1016/j.jep.2006.06.009
- Fiala, E. S. (1977). Investigations into the metabolism and mode of action of the colon carcinogens 1,2-dimethylhydrazine and azoxymethane. *Cancer* 40, 2436–2445.
- Franke, S. I. R., Prá, D., Erdtmann, B., Henriques, J. A. P., & Silva, J. (2005). Influence of orange juice over the genotoxicity induced by alkylating agents: An in vivo analysis. *Mutagenesis*, 20(4), 279–283. doi:10.1093/mutage/gei034
- Genovese, M. I., Pinto, M. S., Goncalves, A.E. S. S., & Lajolo, F. M. (2008). Bioactive Compounds and Antioxidant Capacity of Exotic Fruits and Commercial Frozen Pulps from Brazil. *Food Science and Technology International*, 14, 207–214. doi:10.1177/1082013208092151
- Gibaud, S., Andreaux, J. P., Weingarten, C., Renard, M., & Couvreur, P. (1994) Increased bone marrow toxicity of doxorubicin bound to nanoparticles. *European Journal of Cancer*, 30(6), 820–826.
- Gilleron, M., Marechal, X., Montaigne, D., Franczak, J., Neviere, R., & Lancel, S. (2009). NADPH oxidases participate to doxorubicin-induced cardiac myocyte apoptosis. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 388(4), 727–731. doi:10.1016/j.bbrc.2009.08.085

- Gomes, E. D. B., Ramalho, S. A., & Gualberto, N. C. (2013). A Rapid Method for Determination of Some Phenolic Acids in Brazilian Tropical Fruits of Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes) and Umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Camara) by UPLC. *Journal of Analytical Sciences, Methods and Instrumentation*, 3, 1–10.
- Hernandes, L. C., Aissa, A. F., Almeida, M. R., Darin, J. D. C., Rodrigues, E., Batista, B. L., Júnior, F. B., Mercadante, A. Z., Bianchi, M. L. P., & Antunes, L. M. G. (2014). In vivo assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. *Food Research International*, 62, 121–127. doi:10.1016/j.foodres.2014.02.036
- Hirschmann, G. S., & Arias, A. R. (1990). A survey of medicinal plants of Minas Gerais, Brazil. *Journal of Ethnopharmacology* 29, 159–172.
- Institute of Medicine. (1999–2011). *Food and Nutrition Board*. Dietary Reference Intakes. National Academic Press, Washington D.C.
- Kahkonen, M. P., Hopia, A. I., & Heinonen, M. (2001). Berry phenolics and their antioxidant activity. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4076–4082.
- Kalra, S., & Jood, S. (1998). Biological evaluation of protein quality of barley. *Food Chemistry*, 61, 35–39.
- Kim, G. N., Kwon, Y. I., & Jang, H. D. (2011). Protective mechanism of quercetin and rutin on 2,2'-azobis(2-amidinopropane)dihydrochloride or Cu²⁺-induced oxidative stress in HepG2 cells. *Toxicology in Vitro*, 25(1), 138–144. doi:10.1016/j.tiv.2010.10.005
- Kumar, V., Akinleye, A. O., Makkar, H. P. S., Angulo-Escalante, M. A., & Becker, K. (2011). Growth performance and metabolic efficiency in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus* L.) fed on a diet containing *Jatropha* platyphylla kernel meal as a protein source. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96, 37–46.
- Larrauri, J. A., Rupérez, P., & Saura-Calixto, F. (1997). Effect of Drying Temperature on the Stability of Polyphenols and Antioxidant Activity of Red Grape Pomace Peels. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 45, 1390–1393. doi:10.1021/jf960282f

- Lederman, I. E., Silva Júnior, J. F., Bezerra, J. E. F., & Espíndola, A. C. M. (2000). Mangaba (*Hancornia speciosa* Gomes). Jaboticabal: São Paulo. 35 p. (Série Frutas Nativas).
- Lima, R. O. A., Azevedo, L., Ribeiro, L. R., & Salvadori, D. M. F. (2003). Study on the mutagenicity and antimutagenicity of a natural food colour (annatto) in mouse bone marrow cells. *Food and Chemical Toxicology* 41, 189–192.
- Macgregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., Salamone, M. F., & Tice, R. R., Wild, D. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research*, 189, 103–112.
- Marcarini, J.C., Tsuboy, M.S.F., Luiz, R.C., Ribeiro, L.R., Hoffmann-Campo, C.B., Mantovani, M.S. (2011). Investigation of cytotoxic, apoptosis-inducing, genotoxic and protective effects of the flavonoid rutin in HTC hepatic cells. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 63 (5), 459-65.
- Marinho, D. G., Alviano, D. S., Matheus, M. E., Alviano, C. S., & Fernandes, P. D. (2011). The latex obtained from *Hancornia speciosa* Gomes possesses anti-inflammatory activity. *Journal of Ethnopharmacology* 135, 530–537.
- Mihara, M., & Uchiyama, M. (1978). Determination of malonaldehyde precursor in tissues by thiobarbituric acid test. *Analytical Biochemistry*, 86, 271–278. doi:10.1016/0003-2697(78)90342-1
- Moraes, T. D. M., Rodrigues, C. M., Kushima, H., Bauab, T. M., Villegas, W., Pellizzon, C. H., Brito, A. R. M. S., & Hiruma-Lima, C. A. (2008). *Hancornia speciosa*: Indications of gastroprotective, healing and anti-*Helicobacter pylori* actions. *Journal of Ethnopharmacology*, 120, 161–168. doi:10.1016/j.jep.2008.08.001
- Muthu, R., & Vaiyapuri, M. (2013). Synergistic and individual effects of umbelliferone with 5-fluorouracil on tumor markers and antioxidant status of rat treated with. *Biomedicine & Aging Pathology*, 3(4), 219–227. doi:10.1016/j.biomag.2013.08.007
- Newell, L. E., & Heddle, J. A. (2004). The potent colon carcinogen, 1,2-dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. *Mutation Research*, 564, 1–7.

- Nowsheen, S., & Yang, E. S. (2012). The intersection between DNA damage response and cell death pathways. *Experimental Oncology*, *34*, 243–254.
- Neves, L. C., Tosin, J. M., Benedette, R. M., & Ciseros-Zevallos, L. (2015). Post-harvest nutraceutical behaviour during ripening and senescence of 8 highly perishable fruit species from the Northern Brazilian Amazon region. *Food Chemistry* *174*, 188–196.
- Nobili, S., Lippi, D., Witort, E., Donnini, M., Bausi, L., Mini, E., & Capaccioli, S. (2009). Natural compounds for cancer treatment and prevention. *Pharmacological Research*, *59*, 365–378. doi:10.1016/j.phrs.2009.01.017
- Paiva, M. C., Manica, I., Fioravanco, J. C., & Kist, H. (1997). Caracterização química dos frutos de quatro cultivares e de duas seleções de goiabeira. *Revista Brasileira de Fruticultura*, *19*, 57–63.
- Pott, A., & Pott, V. J. (1994). *Plantas do Pantanal*. EMBRAPA, Planaltina, D.F., Brazil, pp. 41.
- R Development Core Team. (2010). A language and environment for statistical computing. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, Retrieved from <http://www.R-project.org>
- Ramaiya, S. D., Bujang, J. S., Zakaria, M. H., King, W. S., & Shaffiq Sahrir, M. A. (2013). Sugars, ascorbic acid, total phenolic content and total antioxidant activity in passion fruit (*Passiflora*) cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *93*, 1198–1205. doi:10.1002/jsfa.5876
- Ramful, D., Tarnus, E., Aruoma, O. I., Bourdan, E., & Bahorun, T. (2011). Polyphenol composition, vitamin C content and antioxidant capacity of Mauritian citrus fruit pulps. *Food Research International*, *44*, 2088–2099.
- Ribeiro, S. S. Jesus, A. M., Anjos, C. S., Silva, T. B., Santos, A. D. C., Jesus, J. R., Andrade, M. S., Sampaio, T. S., Gomes, W. F., Alves, P. B., Carvalho, A. A., Pessoa, C., Moraes, M. O., Pinheiro, M. L. B., Prata, A. P. N., Blank, A. F., Silva-Mann, R., Moraes, V. R. S., Costa, E. V., Nogueira, P. C. L., & Bezerra, D. P. (2012). Evaluation of the cytotoxic activity of some Brazilian medicinal plants. *Planta Medica*, *78*, 1601- 1606. doi: 10.1055/s-0032-1315043.

- Risio, M., Lipkin, M., Newmark, H., Yang, K., Rossini, F. P., Steele, V. E., Boone, C. W., & Kelloff, G. J. (1996). Apoptosis and cell replication, and western-style diet-induced tumorigenesis in mouse colon. *Cancer Research*, *56*, 4910–4916.
- Robards, K., Prenzler, P. D., Tucker, G., Swatsitang, P., & Glover, W. (1999). Phenolic compounds and their role in oxidative processes in fruits. *Food Chem.* *66*, 401–436.
- Rodrigues-Amaya, B. B. (2001). *A guide to carotenoid analysis in foods*. Washington: ILST Press.
- Rothfuss, A., Honma, M., Czich, A., Aardema, M. J., Burlinson, B., Galloway, S., Hamada, S., Kirkland, D., Heflich, R. H., Howe, J., Nakajima, M., O'Donovan, M., Plappert-Helbig, U., Priestley, C., Recio, L., Schuler, M., Uno, Y., & Martus, H. J. (2011). Improvement of in vivo genotoxicity assessment: Combination of acute tests and integration into standard toxicity testing. *Mutation Research*, *723*(2), 108–120.
- Rufino, M. D. S. M., Alves, R. E., Brito, E. S., Pérez-Jiménez, J., Saura-Calixto, F., & Mancini-Filho, J. (2010). Bioactive compounds and antioxidant capacities of 18 non-traditional tropical fruits from Brazil. *Food Chemistry*, *121*(4), 996–1002. doi:10.1016/j.foodchem.2010.01.037
- Rufino, M. S. M., Fernandes, F. A. N., Alves, R. E., & Brito, E. S. (2009). Free radical-scavenging behaviour of some north-east Brazilian fruits in a DPPH system. *Food Chemistry*, *114*(2), 693–695. doi:10.1016/j.foodchem.2008.09.098
- Sawa, T., Nakao, M., Akaike, T., Ono, K., & Maeda, H. (1999). Alkylperoxyl radical scavenging activity of various flavonoids and other phenolic compounds: implications for the anti-tumor promoter effect of vegetables. *J Agric Food Chem*, *47*, 397–402.
- Silva, F. C., Arruda, A., Ledel, A., Dauth, C., Romão, N. F., Viana, R. N., Ferraz, A. B. F., Picada, J. N., & Pereira, P. (2012). Antigenotoxic effect of acute, subacute and chronic treatments with Amazonian camu-camu (*Myrciaria dubia*) juice on mice blood cells. *Food and Chemical Toxicology*, *50*(7), 2275–2281. doi:10.1016/j.fct.2012.04.021

- Silva, G. C., Braga, F. C., Lima, M. P., Pesquero, J. L., Lemos, V. S., & Cortes, S. F. (2011). Hancornia speciosa Gomes induces hypotensive effect through inhibition of ACE and increase on NO. *Journal of Ethnopharmacology*, *137*(1), 709–713. doi:10.1016/j.jep.2011.06.031
- Silva, M. R., Lacerda, D. B. C. L., Santos, G. G., & Martins, D. M. D. O. (2008). Caracterização química de frutos nativos do cerrado. *Ciência Rural*, *38*, 1790–1793. doi:10.1590/S0103-84782008000600051
- Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Silva, T. L. T., Lima, L. C. O., Pio, R., & Queiroz, F. (2014). Determination of the bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Brazilian blackberry, red raspberry, strawberry, blueberry and sweet cherry fruits. *Food Chemistry*, *156*, 362–368. doi:10.1016/j.foodchem.2014.01.125
- Silva, P. S. L., Sa, W. R., Marigule, K. H., Barbosa, A. P. R., & Oliveira, O. F. (2002). Distribuição do teor de sólidos solúveis totais em frutos de algumas espécies de clima temperado. *Revista Caatinga*, *15*, 19–23.
- Souza, V. R., Pereira, P. A. P., Queiroz, F., Borges, S. V., & Carneiro, J. D. S. (2012). Determination of bioactive compounds, antioxidant activity and chemical composition of Cerrado Brazilian fruits. *Food Chemistry*, *134*(1), 381–386. doi:10.1016/j.foodchem.2012.02.191
- Šimůnek, T., Štěrba, M., Popelová, O., Adamcová, M., Hrdina, R., & Gerši, V. (2009). Anthracycline-induced cardiotoxicity: Overview of studies examining the roles of oxidative stress and free cellular iron. *Pharmacological Reports*, *61*, 154–171. doi:10.1182/asheducation-2001.1.499
- Sulaiman, S. F., Yusoff, N. A. M., Eldeen, I. M., Seow, E. M., Sajak, A. A. B., Supriatno, & Ooi, K. L. (2011). Correlation between total phenolic and mineral contents with antioxidant activity of eight Malaysian bananas (*Musa* sp.). *Journal of Food Composition and Analysis*, *24*(1), 1–10. doi:10.1016/j.jfca.2010.04.005
- Tice, R. R., Agurell, E., Anderson, D., Burlinson, B., Hartmann, A., Kobayashi, H., Miyamae, Y., Rojas, E., Ryu, J. C., & Sasaki, Y. F. (2000). Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. *Environ. Mol. Mutagen.* *35* (3), 206–221.

- Valko, M., Rhodes, C.J., Moncol, J., Izakovic, M., & Mazur, M. (2006). Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer. *Chemico-Biological Interactions* 160, 1–40.
- Vanhouwaert, a, Vanparys, P., & Kirsch-Volders, M. (2001). The in vivo gut micronucleus test detects clastogens and aneugens given by gavage. *Mutagenesis*, 16(1), 39–50. doi:10.1093/mutage/16.1.39
- Venâncio, V. P., Silva, J. P. L., Almeida, A. A., Brigagão, M. R. P. L., & Azevedo, L. (2012). Conventional (MG-BR46 Conquista) and Transgenic (BRS Valiosa RR) Soybeans Have No Mutagenic Effects and May Protect Against Induced-DNA Damage In Vivo. *Nutrition and Cancer*, 64(5), 725–731. doi:10.1080/01635581.2012.687677
- Vendramini, A. L., & Trugo, L. C. (2000). Chemical composition of acerola fruit (*Malpighia puniceifolia* L.) at three stages of maturity. *Food Chemistry*, 71, 195–198. doi:10.1016/S0308-8146(00)00152-7
- Waterhouse, A. L. (2002). Polyphenolics: Determination of total phenolics. In R. E. Wrolstad (Ed.), *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*. New York: John Wiley & Sons.
- Weisburger, J. H., Reddy, B. S., & Wynder, E. L. (1977). Colon cancer: its epidemiology and experimental production. *Cancer* 40, 2414–2420. Zheng, W., & Wang, S. Y. (2003). Oxygen Radical Absorbing Capacity of Phenolics in Blueberries, Cranberries, Chokeberries, and Lingonberries. *J. Agric. Food Chem.*, 51, 502-509.