

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MATO GROSSO DO SUL  
UNIDADE UNIVERSITÁRIA DE MUNDO NOVO  
CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**LESLEY DE SOUZA LUPATINI**

**ESTUDO DO EFEITO MODULADOR DO ÓLEO DE CHIA  
(*Salvia hispanica*) ASSOCIADO AO BENZO(A)PIRENO E AO  
CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA**

Mundo Novo – MS

Março/2015

**LESLEY DE SOUZA LUPATINI**

**ESTUDO DO EFEITO MODULADOR DO ÓLEO DE CHIA  
(*Salvia hispanica*) ASSOCIADO AO BENZO(A)PIRENO E AO  
CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>Dr<sup>a</sup> Zaira da Rosa Guterres

Mundo Novo – MS

Março/2015

**LESLEY DE SOUZA LUPATINI**

**ESTUDO DO EFEITO MODULADOR DO ÓLEO DE CHIA  
(*Salvia hispanica*) ASSOCIADO AO BENZO(A)PIRENO E AO  
CLORIDRATO DE DOXORRUBICINA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Estadual de Mato Grosso do Sul, como parte dos requisitos para obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

APROVADO EM \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2015

Prof. Dr<sup>a</sup>. Zaira da Rosa Guterres - Orientadora – UEMS \_\_\_\_\_

Prof. Dr. Carlos Alexandre Fernandes– UEMS \_\_\_\_\_

Prof. Dr<sup>a</sup>. Ana Francisca Gomes da Silva– UEMS \_\_\_\_\_

## **AGRADECIMENTOS**

Gostaria de agradecer aos meus amigos e familiares por todo auxílio e incentivo no decorrer do curso, a todos os professores que participaram diretamente ou indiretamente de minha formação e a todos os funcionários da universidade pelo apoio prestado. Agradeço em especial à professora Zaira da Rosa Guterres pela excelente orientação, paciência e dedicação durante o desenvolvimento deste trabalho, através do qual aprendi muitas coisas importantes, algumas das quais levarei pelo resto da vida.

## RESUMO

A Chia (*Salvia hispanica*) é uma planta mexicana pertencente à família das Labiadas, representava uma das quatro principais sementes cultivadas pelos povos pré-colombianos, principalmente os Astecas que a utilizavam como remédio e componente nutricional. Atualmente foi redescoberta, pois suas sementes são ricas em ácidos graxos poli-insaturados, com atividade antioxidante e compostos essenciais para a manutenção do organismo. São atribuídos a esta planta vários benefícios ao organismo, dentre eles a redução de problemas cardiovasculares, psoríase, depressão, Alzheimer, diabetes, artrite e câncer. Considerando a ampla utilização do óleo de Chia na atual sociedade, este trabalho teve por objetivo investigar o efeito modulador deste óleo quando associado ao benzo(a)pireno e ao cloridrato de doxorrubicina, utilizando o ensaio SMART (SomaticMutationandRecombination Test), um teste capaz de detectar atividades de mutação e recombinação somática, com a perda de heterozigose, que pode ser observada nas formas de diferentes tricomas (*mwh*, *flr*<sup>3</sup>) presentes nas asas de *Drosophila melanogaster*. Os resultados obtidos com o protocolo de genotoxicidade indicam que o óleo de Chia não é genotóxico, no entanto, ao associar este óleo a compostos com capacidade mutagênica já comprovada (doxorrubicina e benzoapireno), ficou clara sua atividade protetora podendo-se verificar em alguns tratamentos uma redução de até 97% na frequência de formação de clone induzida pela Doxorrubicina. Os resultados também apontaram que o óleo de chia oferece proteção contra o estresse oxidativo mesmo em pequenas concentrações (0,5%), contudo verificou-se uma maior redução no número de manchas induzidas pela doxorrubicina na concentração mais elevada (2%). O óleo de Chia na concentração de 1% quando associado ao BaP, reduziu em 87% os danos ocasionados pelo BaP, somente nos descendentes HB, provavelmente por neutralizar os radicais livres produzidos. Sendo assim, os dados obtidos estão de acordo com a literatura que descreve este óleo com capacidade de prevenir o estresse oxidativo.

**Palavras-chave:** SMART. Antioxidante. Fitoterápico.

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	6
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	8
2.1. ÓLEO DE CHIA .....	8
2.2. SMART TEST .....	8
2.3. CRUZAMENTOS .....	9
2.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS .....	10
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	10
4. CONCLUSÃO .....	18
REFERÊNCIAS .....	19

## 1. INTRODUÇÃO

Células somáticas estão sujeitas a mecanismos de mutação, perda de heterozigose e rearranjo de seu material genético, o acúmulo destas alterações pode levar a formação de células modificadas (cancerosas) que podem não mais responder aos mecanismos de controle de proliferação, morte e diferenciação celular (BRAGA et al., 2004).

Segundo Bergerot (2006) o câncer pode ser resultado de fatores de ordem genética, intrínsecos do hospedeiro ou ambiental, sendo este último o responsável pela maioria dos carcinomas atuais. Verifica-se que “entre as mortes por câncer atribuídas a fatores ambientais, a dieta contribui com cerca de 35%, seguida pelo tabaco (30%) e outros, como condições e tipo de trabalho, álcool, poluição e aditivos alimentares, os quais contribuem com menos de 5%” (GARÓFOLO et al., 2004, p.496).

Os alimentos podem fornecer componentes bioativos benéficos e/ou nocivos à saúde, por isso, é necessário cuidados, pois algumas destas substâncias podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). Além disso, uma alimentação saudável e balanceada é essencial, uma vez que esta fornece todos os nutrientes e compostos necessários ao bom funcionamento do organismo e prevenção de doenças.

A busca pela alimentação ideal tem impulsionado o desenvolvimento de vários estudos que relacionam o consumo de alimentos a prevenção de doenças (SCHUH et al., 2010). Como consequência desta busca, alguns alimentos estão se destacando no mercado pela sua composição nutricional, como o caso da Chia (*Salvia hispanica*) que ficou famosa devido à presença de compostos essenciais a manutenção do organismo. Esta é uma planta mexicana pertencente à família das Labiadas (Lamiaceae), representava uma das quatro principais sementes cultivadas pelos povos pré-colombianos, principalmente os Astecas que a utilizavam como remédio e componente nutricional, sendo uma importante fonte energética durante guerras e longas jornadas (AYERZA; COATES, 2005).

Esquecida por algum tempo foi recentemente redescoberta, pois esta é a fonte mais rica em ácidos graxos importantes e antioxidantes naturais disponíveis no mercado, o que resultou nos últimos tempos em uma elevada procura por este produto (AYERZA; COATES, 2005).

Entre os ácidos graxos presentes no óleo de Chia o ômega-3 merece destaque, visto que se trata de um ácido graxo poli-insaturado essencial o qual não é produzido pelo organismo, necessitando ser ingerido diariamente através da dieta, pois este traz vários

benefícios ao organismo, dentre eles a redução de problemas cardiovasculares, psoríase, depressão, Alzheimer, diabetes, artrite e câncer (SILVA, 2011).

De fato é possível encontrar uma grande quantidade de informações sobre a Chia na sociedade atual, muitos livros a tratam exclusivamente, assim como as mídias digitais que fazem uma verdadeira apologia a seu uso na prevenção e tratamento de diversos males. Com isso sua utilização aumentou em muito, análogo ao que aconteceu no passado com alguns vegetais utilizados como fitoterápicos, que devido à falta de eficácia acabaram sendo desacreditados e sua utilização passou a não ser mais aconselhada (LEMOS JÚNIOR; LEMOS, 2012).

Diferente do óleo de Chia que Ayerza e Coates (2005) descrevem com propriedades antioxidantes, alguns compostos possuem atividade oxidante reconhecida, como o caso da doxorubicina (QUILES et al., 2002) e do benzo(a)pireno (ALMEIDA et al., 2005).

Segundo Quiles et al. (2002) a doxorubicina(DXR) é um antibiótico antineoplásico da classe das antraciclinas que possui dois mecanismos fundamentais de ação no organismo: indução de danos ao DNA e a produção de radicais livres. Quanto à indução de danos ao DNA, a DXR pode ser classificada como um agente intercalante, que tem a capacidade de interagir com as bases nitrogenadas CG (citosina e guanina), levando a formação de aductos no DNA, podendo acarretar troca de cromátides-irmãs e aberrações cromossômicas (ALMEIDA et al., 2005), também interage com a enzima topoisomerase II, impedindo a re-ligação das duplas fitas, causando lesão permanente a molécula do DNA (FILYAK et al., 2007). Almeida et al. (2005) destaca algumas aplicações farmacológicas da DXR que incluem o uso clínico no tratamento dos mais variados tipos de câncer.

Já o benzoapireno (BaP) é um hidrocarboneto aromático policíclico, pode ser proveniente de várias fontes antropogênicas como queima de carvão, escapamento de veículo, fumaça de cigarro, dentre outras, também pode ser proveniente de fontes ambientais como erupções vulcânicas e queimadas ou ainda estar presente em diversas matrizes, como solo, água, ar e alimentos (CARUSO; ALABURDA, 2008).

Apresentando propriedades pré-carcinogênicas e/ou mutagênicas para homens e animais, o BaP somente é considerado carcinogênico após sofrer oxidação no organismo, podendo então ligar-se covalentemente ao DNA rompendo a ligação entre as bases G-C causando alterações no código genético (SMITH et al., 2008).

Ao associar o óleo de Chia ao DXR e BaP espera-se que este diminua a capacidade mutagênica destes compostos, pois entre os componentes nutricionais do óleo alguns merecem destaque, como o caso dos ácidos graxos poli-insaturados (ácido alfa-linolênico e

ômega-3) que são moduladores do sistema de defesa antioxidante celular. Os antioxidantes, segundo Pereira et al. (2009) possuem reconhecida ação contra o estresse oxidativo, auxiliando assim na prevenção de carcinomas e outros males que podem acometer seres humanos. Contudo Bianchi e Antunes (1999) destacam que compostos antioxidantes devem estar presentes em concentrações ideais, pois em excesso tornam-se tóxicos podendo interferir na atividade enzimática e estrutural de uma célula.

Os autores Lemos-Júnior e Lemos (2012) realizaram uma pesquisa analisando vários estudos feitos até o momento e concluíram que a Chia ainda não pode ser considerada um fitoterápico, sendo necessários estudos adicionais para subsidiar sua eficácia.

Considerando estas informações e a ampla utilização do óleo de Chia na atual sociedade, este trabalho teve por objetivo investigar o efeito modulador deste óleo quando associado ao benzo(a)pireno ou cloridrato de doxorubicina que são compostos com capacidade mutagênica já comprovada por estudos, utilizando para isto o ensaio SMART (Somatic Mutation and Recombination Test) em asas de *Drosophila melanogaster*.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1. ÓLEO DE CHIA**

Com o nome comercial de Essenchia, o óleo de Chia (OC) utilizado neste experimento foi comprado no varejo sendo produzido pelo laboratório farmacêutico Herbarium considerado referência em Fitomedicina. Na breve descrição do produto disponível, esta empresa especifica que este óleo foi extraído das sementes por meio de prensagem a frio, este método segundo Migliavacca et al. (2014) é o mais utilizado na extração do óleo das sementes de Chia e consiste basicamente na compressão mecânica das sementes.

### **2.2. SMART TEST**

Graf et al.(1984) descreveu o Somatic Mutation and Recombination Test (SMART), capaz de detectar atividades de mutação e recombinação somática em tricomas presentes nas asas de *Drosophila melanogaster*. Neste teste ocorre a exposição de um grande número de células em divisão mitótica localizadas no disco imaginal que irá formar as asas, ao agente químico que se deseja verificar a genotoxicidade e/ou antigenotoxicidade. Durante esta exposição podem ocorrer alterações genéticas que podem ser identificadas através de tricomas diferenciados nas asas de *D. melanogaster* (GRAF et al.,1984).

A manifestação fenotípica destes tricomas é resultante de marcadores genéticos presentes no cromossomo 3, sendo possível distinguir três tipos distintos, através da caracterização dos pelos da asa, o *mwh* (multiple wing hairs) que resulta em múltiplos pelos por célula da asa, *ORR/flr<sup>3</sup>* (*ORR/flare<sup>3</sup>*) que apresenta pelos simples e o *flr<sup>3</sup>* (*flare<sup>3</sup>*) que resulta em pelos modificados ou mal formados em forma de chama (GRAF et al.,1984).

### 2.3. CRUZAMENTOS

O SMART foi realizado por meio de cruzamentos experimentais entre linhagens: (*mwh*, *flr<sup>3</sup>* e *ORR*) de *D. melanogaster*. Com essas linhagens foram realizados dois diferentes cruzamentos: 1] cruzamento padrão (ST- *standard cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens *flr<sup>3</sup>* e 2] cruzamento de alta bioativação (HB- *high bioactivation cross*) entre machos “*mwh*” e fêmeas virgens *ORR/flr<sup>3</sup>*.

Para a coleta de ovos, os casais dos cruzamentos ST e HB, foram transferidos para frascos contendo base ágar-ágar, coberta com uma camada de fermento biológico suplementado com sacarose, onde permaneceram por um período de 8 horas. Posteriormente as larvas de terceiro estágio de desenvolvimento  $72 \pm 4$  h foram lavadas e coletadas com água corrente com auxílio de peneira de malha fina e tratadas seguindo dois protocolos (genotoxicidade e antígenotoxicidade). No protocolo de genotoxicidade as larvas foram transferidas para frascos de vidro contendo 1,5 g de meio de cultura alternativo (purê de batata instantâneo Yoki® - Yoki Alimentos S.A.) reidratado com soluções contendo diferentes concentrações (0,5%; 1% e 2%.) de óleo de Chia. Para a avaliação da antígenotoxicidade, as larvas foram transferidas para frascos contendo meio de cultura alternativo reidratado com soluções contendo diferentes concentrações (0,25%; 0,5% e 1%) de óleo de Chia, associados com cloridrato de doxorubicina (DXR) 0,2 mM, ou associados a 2mM de BaP. Em ambos os protocolos foram utilizados, como controle positivo DXR (0,2mM) e BaP (2mM) e como controle negativo o solvente (água Milli-Q, 1% de Tween-80 e 3% etanol).

Adultos emergentes portadores dos dois tipos de genótipos: *mwh + / + flr<sup>3</sup>* (trans-heterozigoto marcado - MH) e *mwh + / + TM3, Bd<sup>S</sup>* (heterozigoto balanceado – BH) foram coletados e fixados em etanol 70%. As asas foram destacadas e montadas entre lâminas e lamínulas com solução de Faure (30 g goma arábica, 50 g de hidrato de cloral, 100 mL de água e 20 mL de glicerol).

## 2.4. ANÁLISE DOS RESULTADOS

A análise das lâminas preparadas foi feita em microscópio óptico com magnificação de 400 X, quando encontradas manchas mutantes foram registradas para posterior análise dos dados. A análise estatística dos resultados foi feita segundo Frei e Würigler (1988) para os protocolos de genotoxicidade/antigenotoxicidade e Abrahan (1994) na determinação porcentagem de inibição ou redução.

## 3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A tabela 1 apresenta os resultados obtidos no protocolo de genotoxicidade, dos descendentes dos cruzamentos ST e HB tratados com 0,5%; 1% e 2% de óleo de Chia.

Na linhagem ST as frequências de mutações observadas em todas as concentrações avaliadas foram de aproximadamente 03 manchas simples pequenas; 03 manchas simples grandes, sendo observada somente uma mancha gêmea em todas as concentrações. A frequência de mutações observadas na linhagem HB foi ligeiramente superior a ST, variando entre 07 e 09 manchas simples pequenas para todas as concentrações de OC avaliadas, quanto a manchas gêmeas foram observadas 02 manchas nas concentrações de 0,5% e 2% de OC. O número de manchas observadas nos controles negativos ST e HB foi respectivamente de 03 e 10.

A frequência de formação de clone observada na linhagem ST variou entre 0,40 e  $0,51 \times 10^{-5}$  células por divisão enquanto que na linhagem HB este número variou entre 0,81 e  $1,12 \times 10^{-5}$ . Comparando-se a frequência de formação de clones por divisão celular, entre os grupos tratados com o óleo de Chia, com o respectivo controle negativo, verifica-se que não há diferenças estatísticas significativas, em ambos os cruzamentos ST e HB. Estes resultados indicam que nas concentrações avaliadas o óleo de Chia não possui atividade genotóxica.

Os resultados obtidos com o óleo de Chia, são semelhantes aos encontrados por Anter et al. (2010) com o óleo de oliva em ensaio SMART, nas concentrações 1,25 a 12,5%, nos descendentes dos cruzamentos ST e HB, isto é, ambos os óleos não apresentam atividade genotóxica.

**Tabela 1** – Frequências de manchas mutantes observadas em asas de descendentes de *D. melanogaster* dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratados com óleo de Chia.

Cruzamento	Tratamento e concentração	N. de Individ. (N)	Manchas por indivíduo ( no. de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> ( n )	Frequência de formação de clone /10 <sup>-5</sup> células por divisão	
			MSP <sup>d</sup> (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	MSG <sup>e</sup> (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	MG <sup>f</sup> <i>m</i> = 5	TM <sup>g</sup> <i>m</i> = 2		Observado	Controle corrigido
ST	CN	20	0,10 (02)	0,05 (01)	0,00 (00)	0,15 (03)	3	0,30	-
	OC 0,5%	20	0,15 (03) i	0,10 (02) i	0,00 (00) i	0,25 (05) i	5	0,51	0,21
	OC 1%	20	0,15 (03) i	0,05 (01) i	0,05 (01) i	0,25 (05) i	5	0,51	0,21
	OC 2%	20	0,15 (03) i	0,05 (01) i	0,00 (00) i	0,20 (04) i	4	0,40	0,10
HB	CN	20	0,40(08)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,50 (10)	10	1,02	-
	OC 0,5%	20	0,35(07)i	0,00 (00) i	0,10 (02) i	0,45 (09) i	9	0,92	-0,1
	OC 1%	20	0,40(08) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,40 (08) -	8	0,81	-0,21
	OC 2%	20	0,45(09)i	0,00 (00) i	0,10 (02) i	0,55 (11) i	11	1,12	0,1

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würgler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. *m*, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância  $a = b = 0,05$ ; <sup>b</sup> Incluindo manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras; <sup>c</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas; <sup>d</sup> Manchas simples pequenas; <sup>e</sup> Manchas simples grandes; <sup>f</sup> Manchas gêmeas; <sup>g</sup> Somativa de todas as manchas mutantes observadas; (CN): Controle Negativo, (OC): Óleo de Chia.

A tabela 2 apresenta os resultados obtidos no protocolo de antigenotoxicidade, dos descendentes dos cruzamentos ST e HB tratados com o óleo de Chia nas concentrações de 0,5%; 1% e 2% associados a 0,2mM de DXR. Nos descendentes do cruzamento ST, verifica-se que os indivíduos tratados com DXR apresentaram uma frequência de formação de clones de  $14,65 \times 10^{-5}$ , enquanto que os co-tratados com 0,25%; 0,5% e 1% de óleo de Chia e DXR, apresentaram frequência de formação de clones, respectivamente de 0,30; 0,41 e  $0,82 \times 10^{-5}$ .

O óleo de Chia apresentou efeito protetor contra os danos genotóxicos da DXR, reduzindo drasticamente o número de manchas observadas nos grupos tratados, quando comparados com o controle positivo DXR, verifica-se uma redução de 97% nas concentrações (0,25% e 0,5 %) e redução de 94% na concentração de 1% de OC. Resultado similar foi observado nos descendentes do cruzamento HB, cujas reduções variaram de 77% a 97% (tabela 2).

Resultado semelhante foi obtido por Anter et al. (2010) quando avaliou o óleo de oliva associado com peróxido de hidrogênio no ensaio SMART. De acordo com Fragiorge et al. (2007) o ácido ascórbico reduziu os efeitos da DXR no ensaio SMART, por sequestrar os radicais livres gerados pela DXR. Também, Valadares et al. (2008), utilizando o ensaio SMART, verificou que extratos aquosos de própolis, reduziram os efeitos genotóxicos causados pela DXR, por neutralizar os radicais livres gerados. Portanto o óleo de Chia apresenta atividades antigenotóxicas, provavelmente por neutralizar os radicais livres gerados pela DXR.

**Tabela 2** - Frequências de manchas mutantes observadas em asas de *D. melanogaster* descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratados com óleo de Chia associado a cloridrato de doxorubicina.

Cruzamento	Tratamento e concentração	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo ( no. de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> (n)	Frequência de formação de clone /10 <sup>-5</sup> células por divisão		
			MSP <sup>d</sup> (1-2 céls) <sup>b</sup> m = 2	MSG <sup>e</sup> (>2 céls) <sup>b</sup> m = 5	MG <sup>f</sup> m = 5	TM <sup>g</sup> m = 2		Observado	Controle corrigido	Inibição ou redução
ST	CN	20	0,10 (02)	0,05 (01)	0,00 (00)	0,15 (03)	3	0,30	-	-
	DXR	20	2,95 (59) +	2,25 (45) +	2,10 (42) +	7,30 (146) +	138	14,95	14,65	-
	OC 0,5% +DXR	20	0,25 (05) +	0,05 (01) +	0,00 (00) +	0,30 (06) +	6	0,61	0,30	97%
	OC 1% + DXR	20	0,20 (04) +	0,10 (02) +	0,05 (01) +	0,35 (07) +	7	0,71	0,41	97%
	OC 2% +DXR	20	0,45 (09) +	0,05 (01) +	0,05 (01) +	0,55 (11) +	11	1,12	0,82	94%
HB	CN	20	0,40(08)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,50 (10)	10	1,02	-	-
	DXR	20	2,95 (59) +	4,05 (81) +	1,05 (21) +	8,05 (161) +	158	16,49	15,47	-
	OC 0,5% +DXR	20	0,85 (17) +	0,85 (17) +	0,50 (10) +	2,20 (44) +	44	4,5	3,48	77%
	OC 1% + DXR	20	1,10(22) +	0,80 (16) +	0,30 (06) +	2,20 (44) +	44	4,5	3,48	77%
	OC 2% +DXR	20	0,30(06) +	0,15 (03) +	0,20 (04) +	0,65 (13) +	13	1,33	0,31	97%

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würzler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05; <sup>b</sup> Incluindo manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras; <sup>c</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas; <sup>d</sup> Manchas simples pequenas; <sup>e</sup> Manchas simples grandes; <sup>f</sup> Manchas gêmeas; <sup>g</sup> Somativa de todas as manchas mutantes observadas; (DXR): Doxorubicina 0,2mM, (CN): Controle Negativo, (OC): Óleo de Chia.

A tabela 3 apresenta os resultados obtidos com os descendentes dos cruzamentos ST e HB, co-tratados com o óleo de Chia nas concentrações de 0,25%; 0,5%; 1% associado a 2mM de benzo(a)pireno. Verifica-se que os descendentes do cruzamento ST, tratados com o controle negativo e BaP, apresentam frequências de mutação respectivamente de 0,30 a 0,31 x 10<sup>-5</sup>, entretanto, comparando-se com os dados obtidos no cruzamento HB, verifica-se que a frequência de mutação foi de 1,64 x 10<sup>-5</sup> para o BaP, estes resultados indicam que o BaP é uma substância pró-genotóxica, ou seja, um mutágeno de ação indireta que precisa sofrer metabolização, oxidação, para se ligar covalentemente ao nitrogênio 7 da guanina e gerar um aducto no DNA (SMITH et al., 2007), como a linhagem ST apresenta níveis basais da enzima citocromo P-450, o BaP não foi metabolizado e portanto não causou danos ao DNA.

Os resultados obtidos com os descendentes do cruzamento HB, tratados com o BaP, estão de acordo com a literatura, pois este composto precisa ser metabolizado para se tornar genotóxico. A biotransformação dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPAs), entre eles o BaP, envolve uma série de enzimas que catalisam reações de oxidação, redução e hidrólise (oxigenases de função mista, citocromo P-450, NADPH- citocromo-c-redutase) e de enzimas que catalisam reações de conjugação (sulfotransferase, epóxido hidrolase, glutathione-S-transferase e UDP-glicotransferase) (NETTO et al., 2000).

De acordo com Naspinski et al. (2008) a metabolização do BaP pelo citocromo CYP1A, também pode gerar espécies reativas de oxigênio, produzindo metabólitos tóxicos como epóxidos de BaP no ambiente celular, os quais podem atacar diretamente o DNA. Os aductos gerados pelo BaP no DNA são responsáveis por danos cromossômicos que levam a formação de micronúcleos (MN) (VIENNEAU et al., 1995; SÁNCHEZ et al., 2000).

O óleo de Chia na concentração de 1% quando associado ao BaP, reduziu em 87% os danos ocasionados pelo BaP (tabela 3), provavelmente por neutralizar os radicais livres produzidos.

Com resultados semelhantes aos obtidos com óleo de chia Kelkel et al. (2010) atribuiu as propriedades anticarcinogênicas da cúrcuma e o resveratrol às suas atividades antioxidantes que inibem os radicais livres de ocasionar a peroxidação dos lipídeos de membranas celulares ou de causarem danos oxidativos ao DNA, pois ambos os processos são importantes iniciadores do desenvolvimento de câncer.

**Tabela 3** - Frequências de manchas mutantes observadas em asas de *D. melanogaster* descendentes dos cruzamentos padrão (ST) e de alta bioativação (HB) tratados com óleo de Chia associado ao benzo(a)pireno (BaP).

Cruzamento	Tratamento e concentração	N. de Indiv. (N)	Manchas por indivíduo ( no. de manchas ) diag. estatístico <sup>a</sup>				Total manchas <i>mwh</i> <sup>c</sup> ( n )	Frequência de formação de clone /10 <sup>-5</sup> células por divisão		
			MSP <sup>d</sup> (1-2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 2	MSG <sup>e</sup> (>2 céls) <sup>b</sup> <i>m</i> = 5	MG <sup>f</sup>  <i>m</i> = 5	TM <sup>g</sup>  <i>m</i> = 2		Observado	Controle corrigido	Inibição ou redução
ST	CN	20	0,10 (02)	0,05 (01)	0,00 (00)	0,15 (03)	3	0,30	-	-
	BaP	20	0,20 (04) i	0,00 (00) i	0,10 (02) i	0,30 (06) i	6	0,61	0,31	-
	OC 0,25% + BaP	20	0,30 (06) i	0,20 (04) i	0,05 (01) i	0,55 (11) i	11	1,12	0,82	-
	OC 0,5% + BaP	20	0,30 (06) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,30 (06) i	6	0,61	0,31	-
	OC 1% +BaP	20	0,35 (07) i	0,05 (01) i	0,00 (00) i	0,40 (08) i	8	0,81	0,51	-
HB	CN	20	0,40 (08)	0,10 (02)	0,00 (00)	0,50 (10)	10	1,02	-	-
	BaP	20	1,05 (21) +	0,05 (01) i	0,20 (04) i	1,30 (26) +	26	2,66	1,64	-
	OC0,25% + BaP	20	0,95 (19) i	0,05 (01) i	0,25 (05) i	1,25 (25) i	25	2,56	1,54	-
	OC 0,5% + BaP	20	0,65 (13) i	0,10 (02) i	0,10 (02) i	0,85 (17) i	17	1,74	0,72	-
	OC 1% +BaP	20	0,60 (12) i	0,00 (00) i	0,00 (00) i	0,60 (12) +	12	1,22	0,2	87%

<sup>a</sup>Diagnóstico estatístico de acordo com Frei e Würigler (1988): +, positivo; -, negativo; i, inconclusivo. m, fator de multiplicação para a avaliação de resultados significativamente negativos. Níveis de significância a = b = 0,05; <sup>b</sup> Incluindo manchas simples *flr*<sup>3</sup> raras; <sup>c</sup> Considerando os clones *mwh* para as manchas simples *mwh* e para as manchas gêmeas; <sup>d</sup> Manchas simples pequenas; <sup>e</sup> Manchas simples grandes; <sup>f</sup> Manchas gêmeas; <sup>g</sup> Somativa de todas as manchas mutantes observadas; (BaP): Benzo(a)pireno 2mM, (CN): Controle Negativo, (ÓC): Óleo de Chia.

Ao analisar os resultados, verifica-se que o óleo de Chia oferece proteção contra os efeitos nocivos causados por compostos mutagênicos como a DXR e o BaP, assim como é possível verificar na figura 02 houve redução significativa no número de manchas observadas nos tratados com OC.

Não necessariamente as concentrações de OC mais elevadas apresentaram maior redução no número de manchas induzidas pela DXR, ficando claro que mesmo em pequenas concentrações o óleo de Chia oferece grande proteção contra o estresse oxidativo e outros mecanismos que podem levar a mutação e posteriormente a formação de células cancerosas. Contudo é visível uma tendência de diminuição no número de manchas observadas ao aumentar-se a concentração de OC.

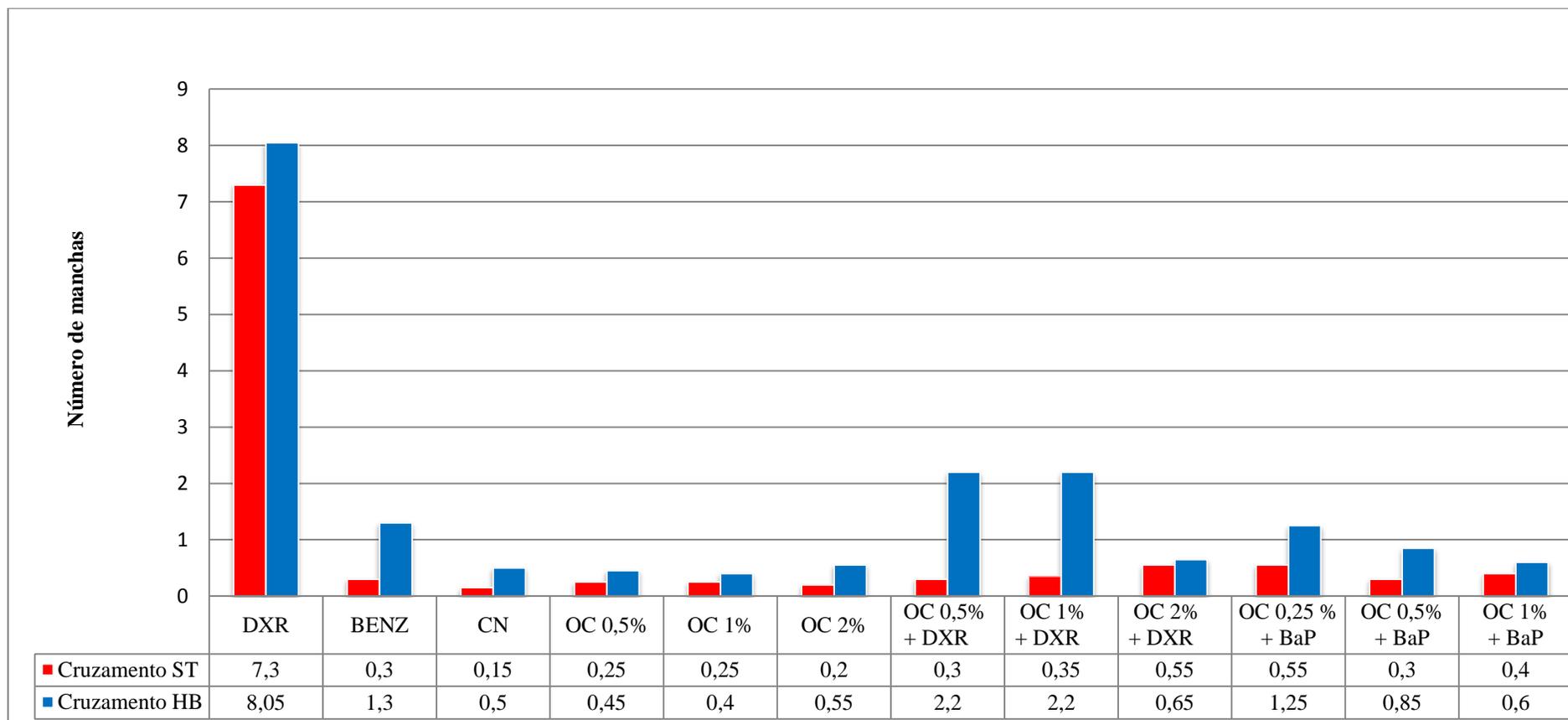
A diferença observada na frequência de manchas entre as linhagens ST e HB, tratados com BaP se deve provavelmente a maior capacidade metabólica da linhagem HB, pois Smith et al. (2008) destaca a necessidade do BaP ser metabolizado no organismo para ser considerado um composto mutagênico.

Segundo Graf e Van Schaik (1992) a maior sensibilidade da linhagem HB a detecção de pró-mutágenos e pró-carcinogênicos se deve aos altos níveis de citocromo P450 que são enzimas de metabolização de xenobióticos, presentes na linhagem *ORR/flr<sup>3</sup>*. Sendo assim a maior frequência de manchas mutantes observadas na linhagem HB se encontra dentro do descrito na literatura, não representando desvios.

Os resultados obtidos confirmam a capacidade antimutagênica do óleo de Chia apresentada na literatura e indicam a presença de substâncias antimutagênicas. De acordo com Ayerza e Coates (2005) o principal composto encontrado no óleo de Chia é o ômega-3, que Silva (2011) descreve como um agente com grande capacidade protetora contra o estresse oxidativo.

Sargi et al. (2013) analisou a capacidade antioxidante e a composição química das sementes de Chia e concluiu que a Chia representa uma excelente fonte de ácidos graxos com atividade antioxidante e compostos importantes para o metabolismo humano, como o ácido alfa-linolênico.

Assim como o observado no óleo de Chia, Pinto (2012) destaca que várias espécies do gênero *Salvia* possuem propriedades protetoras contra o câncer, de acordo, Mathew e Thoppil (2012) encontraram resultados semelhantes aos deste trabalho ao analisar os estratos de três espécies do gênero *Salvia* (*Salvia farinacea*; *Salvia microphylla*; *Salvia splendens*), concluindo em sua pesquisa que os extratos destas plantas possuem efeito antimutagênico.



**Figura 2** – Frequência de manchas mutantes observadas (TM) nos tratamentos. (DXR): Doxorrubicina 0,2mM, (BaP): Benzo(a)pireno 2mM, (CN):Controle Negativo, (OC):Óleo de Chia.

#### **4. CONCLUSÃO**

Os resultados obtidos com o protocolo de genotoxicidade indicam que o óleo de Chia, nas concentrações avaliadas, não é genotóxico, no entanto, ao associar este óleo a compostos com capacidade mutagênica já comprovada (DXR e BaP) ficou evidente sua atividade protetora. Também foi possível verificar que o óleo de chia oferece proteção contra os efeitos nocivos da doxorubicina mesmo em pequenas concentrações (0,5%).

Em alguns tratamentos o óleo de Chia foi capaz de reduzir em 97% a frequência de formação de clone induzida pela doxorubicina, na concentração de 1% reduziu em 87% os danos ocasionados pelo BaP, provavelmente por neutralizar os radicais livres produzidos, sendo assim, os dados obtidos estão de acordo com a literatura que descreve este óleo com capacidade de prevenir o estresse oxidativo.

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, S. K. Antigenotoxicity of coffee in the *Drosophila* assay for somatic mutation and recombination. **Mutagenesis**, Oxford, v. 9, n. 4, p. 383-386, 1994.
- ALMEIDA, V. L.; LEITÃO, A.; REINA, L. C. B.; MONTANARI, C. A.; DONNICI, C. L. Câncer e agentes antineoplásicos ciclo-celular específicos e ciclo-celular não Específicos que interagem com o DNA: Uma introdução. **Química nova**, São Paulo, v. 28, n. 1, p. 118-129, 2005.
- ANTER, J.; SÁNCHEZ C. J.; HAMSS, R.; MOLINA, R. M.; SERRANO, M. A.; ANALLA, M.; MORAG, A. Á. Modulation of genotoxicity by extra-virgin olive oil and some of its distinctive components assessed by use of the *Drosophila* wing-spot test. **MutationResearch**, Nova York, v. 703, n. 2, p. 137-142, 2010.
- ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para nutrição. **Revista de Nutrição**, Campinas, v. 13, n. 2, p. 81-88, 2000.
- AYERZA, R.; COATES, W. **Chia**: Rediscovering a forgotten crop of the Aztecs. Arizona: University of Arizona Press, 2005.
- BERGEROT, C. **Câncer**: O Poder da Alimentação na Prevenção e Tratamento. São Paulo: Cultrix, 2006.
- BIANCHI, 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, 1999.
- BRAGA, P. C. B. B.; TEIXEIRA, V. R.; CHAMMAS, R. Aspectos moleculares da transformação celular: conceitos e implicações. **Dieta, nutrição e câncer**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 79-87, 2004.
- CARUSO, M. S. F.; ALABURDA, J. Hidrocarbonetos policíclicos aromáticos - benzo(a)pireno: uma revisão. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, São Paulo, v.67, n. 1, p. 1-27, 2008.
- FILYAK, Y.; FILYAK, O.; STOIKA, R. Transforming growth factor beta-1 enhances cytotoxic effect of doxorubicin in human lung adenocarcinoma cells of A549 line. **Cell Biology International**, Nova York, v. 31, n.8, p. 851-855, 2007.
- FRAGIORGE, E.J.; SPANÓ, M.A.; ANTUNES, L.M.G. Modulatory effects of the antioxidant ascorbic acid on the direct genotoxicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Genetics and Molecular**, Ribeirão Preto, v. 30, n. 2, p. 449-455, 2007.
- FREI, H.; WÜRGLER, F. E. Statistical Methods to decide whether mutagenicity test data from *Drosophila* assays indicate a positive, negative or inconclusive result. **MutationResearch**, Nova York, v. 203, n. 4, p. 297-30, 1988.

- GARÓFOLO, A.; AVESANI, C. M.; CAMARGO, K. G.; BARROS, M. E.; SILVA, S. R. J.; TADDEI, J. A. A. C.; SIGULEM, D. M. Dieta e câncer: um enfoque epidemiológico. **Revista de nutrição**, Campinas, v. 17, n. 4, p. 491-505, 2004.
- GRAF, U.; VAN SCHAIK, N. Improved high bioactivation cross for the wing Somatic and Recombination Test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, Nova York, v. 271, n. 1, p. 59-71. 1992.
- GRAF, U.; WURGLER, F. E.; KATS, A. J.; FREI, H.; JUON, H.; HALL, C. B. E. e KALE, P. G. Somatic mutation and recombination test in *Drosophila melanogaster*. **Mutation Research**, Reston, v. 6, n. 1, p. 347-377, 1984.
- KELKEL, M.; JACOB, C.; DICATO, M.; DIEDERICH, M. Potential of the dietary antioxidants resveratrol and curcumin in prevention and treatment of hematologic malignancies. **Molecules**, v.15, n. 10, p. 7035-7074, 2010.
- LEMONS JÚNIOR, H. P.; LEMOS, A. L. A. Chia (*Salvia hispanica*). **Diagnóstico e Tratamento**, São Paulo, v. 17, n. 4, p.180-182, 2012.
- MATHEW, J.; THOPPIL, J. E. Investigation of the antimutagenic activity of three *Salvia* extracts. **International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, Madhya Pradesh, v. 4, n. 3, p. 225-230, 2012.
- MIGLIAVACCA, R. A.; SILVA, T. R. B.; VASCONCELOS, A. L. S.; FILHO, W. M.; BAPTISTELLA, J. L. C. O cultivo da chia no brasil: futuro e perspectivas. **Journal of Agronomic Sciences**, Umuarama, v. 3, n. especial, p. 161-179, 2014.
- NASPINSKI, C.; GU, X.; ZHOU, G. D.; TALCOTT, M. S. U.; DONNELLY, K. C.; TIAN, Y. Pregnane X receptor protects HepG2 cells from BaP-induced DNA damage. **Toxicological Sciences**, Oxford, v. 104, n. 1, p. 67-73, 2008.
- NETTO, A. D. P.; MOREIRA, J. C.; DIAS, A. E. X.; ARBILHA, G.; FERREIRA, L. F. V.; OLIVERA, A. S.; BAREK, J. Avaliação da contaminação humana por hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPAs) e seus derivados nitrados (NHPAs): uma revisão metodológica. **Química Nova**, v. 23, n. 6, p. 765-773, 2000.
- PEREIRA, A. L. F.; VIDAL, T. F.; CONSTANT, P. B. L. Antioxidantes alimentares: importância química e biológica. **Nutrire: Revista da Sociedade Brasileira de Alimentação e Nutrição**, São Paulo, v. 34, n. 3, p. 231-247, 2009.
- PINTO, P. G. **Terpenóides em espécies do gênero *Salvia* (lamiaceae)**. 2012. 91 f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Farmácia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2012.
- QUILES, J. L.; HUERTAS, J. R.; BATTINO, M.; MATAIX, J.; TORTOSA, M. C. R. Antioxidant nutrients and adriamycin toxicity. **Toxicology**, Nova York, v. 180, n.1, p. 79-95, 2002.
- SÁNCHEZ, P.; LLORENTE, M. T.; CASTAÑO, A. Flow cytometric detection of micronuclei and cell cycle alterations in fish-derived cells after exposure to three model

genotoxic agents: mitomycin C, vincristine sulfate and benzo (a) pyrene. **Mutation Research**, Nova York, v. 465, n. 1, p. 113-122, 2000.

SARGI, S. C.; SILVA, B. C.; SANTOS, H. M. C.; MONTANHER, P. F.; BOEING, J. S.; SANTOS JÚNIOR, O. O.; SOUZA, N. E.; VISENTAINER, J. V. Antioxidant capacity and chemical composition in seeds rich in ômega-3: chia, flax, and perilla. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 33, n. 3, p. 541-548, 2013.

SCHUCH, J. B.; VOIGT, F.; MALUF, S. W.; ANDRADE, F. M. Nutrigenética: a interação entre hábitos alimentares e o perfil genético individual. **Revista Brasileira de Biociências**, Porto Alegre, v. 8, n. 1, p. 73-84, 2010.

SILVA, R. G. **Efeito modulador do ômega-3 sobre a mutagenicidade e carcinogenicidade da doxorrubicina em células somáticas de *Drosophilamelanogaster***. 2011. 62 f. Dissertação (Pós-graduação em genética e bioquímica) – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2011.

SMITH, C.; MARKS, A. D.; LIEBERMAN, M. **Bioquímica médica básica de Marks: uma abordagem clínica**. Porto Alegre: Artmed, 2008.

VALADARES, B.L.B.; GRAF, U.; SPANÓ, M.A. Inhibitory effects of water extract of propolis on doxorubicin-induced somatic mutation and recombination in *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, n. 3, p. 1103-1110, 2008.

VIENNEAU, D. S.; DEBONI, U.; WELLS, P. G. Initiation of micronuclei by benzo (a) pyrene and benzo (e) pyrene in UDP glucuronosyltransferase deficient cultured rat skin fibroblasts. **Cancer Research**, Toronto, v. 55, n. 5, p. 1045-1051, 1995.