
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS BIOLOGIA
CELULAR E MOLECULAR**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS,
ANTIGENOTÓXICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E ANTICARCINOGENÉTICOS DO
Lupinus albus EM CAMUNDONGOS *Mus musculus***

JAQUELINE APARECIDA DE OLIVEIRA

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Abril/2013

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS CITOTÓXICOS, GENOTÓXICOS, MUTAGÊNICOS,
ANTIGENOTÓXICOS, ANTIMUTAGÊNICOS E ANTICARCINOGENÉTICOS DE
Lupinus albus EM CAMUNDONGOS *Mus musculus***

JAQUELINE APARECIDA DE OLIVEIRA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Aparecida Marin-Morales

Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, Campus de Rio Claro, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas, área de Biologia Celular e Molecular.

Rio Claro- SP

Abril/2013

“Dedico este trabalho à minha família e ao meu
namorado Diego”

“Eu sei que não sou nada, e que talvez nunca tenha tudo.

Aparte isso, eu tenho em mim todos os sonhos do mundo!”

Fernando Pessoa

AGRADECIMENTOS

À Deus por me conceder energia para correr atrás dos meus sonhos e por torná-los possíveis e principalmente por permitir que pessoas maravilhosas façam parte da minha vida, fazendo de mim uma pessoa melhor.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio Mesquita Filho” e ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, por todo suporte técnico e financeiro.

À Prof^a. Dr^a. Maria Ap. Marin-Morales, por ter me aceito em seu grupo de pesquisa, pela orientação neste trabalho, dedicação, exemplo de profissionalismo, pessoa maravilhosa e generosa que é.

À Prof^a. Dr^a. Grasiela Dias de Campos Severi-Aguiar, por ser a primeira pessoa a acreditar no meu potencial e ter me aceito em seu grupo de pesquisa me dando a oportunidade de conhecer a área acadêmica.

Ao meu namorado Diego, por estar caminhando ao meu lado por tanto tempo, fazendo parte dos meus sonhos e escolhas sempre me apoiando, pela paciência, e principalmente pelos finais de semana no biotério trabalhando comigo, tenho muita sorte por ter alguém como você ao meu lado.

À minha família por ser responsável pela pessoa que sou hoje.

Ao meu amigo Thiago Gomes, muito importante quanto a minha carreira profissional, sendo a pessoa que me introduziu no mercado de trabalho como farmacêutica.

Ao pessoal da drogaria “Drogal”, principalmente minhas amigas farmacêuticas: Cintia Falci e Nara Elena que sempre me ajudaram quanto aos horários, para que fosse possível meu ingresso no mestrado.

Ao pessoal do Laboratório de manipulação Drogal, principalmente ao Paulo Henrique que sempre me apoiou e de alguma forma conseguia me ajudar nas horas em que eu mais precisava, a todas as minhas amigas e companheiras (Ana Laura, Claudelice, Juliana, Karen,

Kelin, Marina, Simone e Susana), que sempre me ajudaram quanto aos horários, sendo só assim possível trabalhar e fazer o mestrado, ao Sr. Roberto Lessa pelo apoio e compreensão, enfim á todas as pessoas que eram ligadas a mim e que sempre quando necessário estiveram dispostas a me ajudar.

À CAPES pelo apoio financeiro, pela bolsa de estudos concedida.

À todo departamento de biologia, professores, funcionários, pessoas amigas, que fazem dos nossos dias mais felizes.

Ao departamento de Pós-graduação em especial a Rose e a Josi, que sempre muito simpáticas e prestativas me ajudaram muito.

Ao Profº. Drº. Chaud, que nos disponibilizou a sala onde hoje funciona nosso biotério.

À Patrícia Rosa Oliveira, que nos ajudou no início, na montagem do biotério, nos fornecendo uma boa parte do material necessário, sendo esse apoio inicial a chave principal para a realização deste projeto.

Ao Profº. Drº. Rodrigo Juliano Oliveira da UFMG, que nos forneceu gentilmente a DMH, e que esteve sempre muito disposto e muito prestativo sempre que precisamos de alguma ajuda.

À Profª. Drª. Eliete Luciano, e a técnica Clarice Sibuya do laboratório de biodinâmica, por nos fornecer suporte técnico para a realização das análises bioquímicas.

Ao Sebastião Zanao Filho, técnico do CEIS, e à Marcela Paula, estagiária, pelo suporte e auxílio com as análises da cromatografia gasosa.

À Roberta Kleiner, técnica do laboratório de Mutagênese, pela ajuda nas atividades do laboratório.

Ao Gerson Souza, técnico do laboratório de histologia, pela ajuda com preparo de soluções.

À Sandra Veloso, nossa antiga técnica do laboratório de mutagênese, sempre com palavras amigas e ajudando nas atividades laboratoriais.

À Raquel Hara e à Maria Tereza Pamplona que me auxiliaram desde o início dos experimentos, ensinando muitas das técnicas utilizadas neste projeto.

As meninas: Márcia, Michele, Roberta e Verônica que me ajudaram muito, mesmo sem nunca ter presenciado uma eutanásia, foram firmes e fortes, mostrando que estavam ali pra o que desse e viesse, passando um dia inteiro por vários dias no biotério comigo.

Aos colegas mutagênicos: Bruna, Carolina, Dânia, Jaque, Laís, Leonardo, Livia, Márcia, Matheus, Michele, Nádia, Paula, Thaís, Verônica, Yaliana, pela recepção que tive junto ao grupo, pela companhia, pelas risadas e principalmente pelo apoio e ajuda sempre que necessário.

Aos colegas do laboratório da citogenética, pela companhia, fazendo com que nossos dias no laboratório fossem harmoniosos.

À todos aqueles que porventura não tenham sido citados, mas que com certeza contribuíram de forma importante para a realização deste trabalho.

Aos animais, não poderia deixar de agradecer-los, pois mesmo sem seu consentimento, foram peças fundamentais para a realização deste trabalho e eu convivendo por tanto tempo com eles, aprendi a vê-los com outros olhos, assumi o risco de parecer cruel aos olhos daqueles que estão de fora, porém tenho a certeza de que tudo sempre foi realizado com muito respeito e muito carinho.

“No semblante de um animal que não fala, há todo um discurso que somente um espírito sábio pode realmente entender.”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

O uso de plantas medicinais é uma prática muito antiga e utilizada pela maioria dos povos em todo o mundo. *Lupinus albus* (*L. albus*), conhecido popularmente como tremoço branco, vem sendo usado na medicina popular, em forma de sementes cruas, como regulador de níveis de glicemia e colesterol. Embora descrito na literatura que suas proteínas e alcaloides isolados têm potencial para isto, não se tem qualquer informação científica em relação à eficiência de suas sementes cruas. O objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos, citotóxicos, genotóxicos e antígenotóxicos, mutagênicos e antimutagênicos, carcinogênicos e anticarcinogênicos e também o potencial imunomodulador do extrato aquoso de sementes cruas de *L. albus*, por meio de ensaios de micronúcleo em medula óssea, Focos de criptas aberrantes em cólon, contagem diferencial de leucócitos, níveis de glicemia e colesterol do soro de camundongos da espécie *Mus musculus*, bem como determinar e quantificar, por meio de cromatografia gasosa, alcaloides e ácidos graxos desse extrato. Foi avaliado nos camundongos seus efeitos nas concentrações equivalente a 3 sementes/dia (como utilizado na medicina popular) e 9 sementes/dia. A análise fitoquímica do extrato revelou a presença do alcaloide lupanina, dos ácidos graxos oleico, linoleico, palmítico e esteárico. Porém não foi possível observar, por meio de ensaios bioquímicos, os efeitos hipoglicêmicos de *L. albus* em ambos os protocolos seguidos. Foi observado que os níveis de colesterol apresentaram melhora, para o protocolo com administração da DMH. No ensaio de MN em medula óssea, não foi observado efeito citotóxico, porém foi possível observar efeito genotóxico e mutagênico para o extrato testado na concentração maior no tratamento sub-crônico. Foram também observados efeitos antígenotóxico e antimutagênico, demonstrando uma ação preventiva para as duas concentrações testadas devido a promoção de redução de danos para o pré-tratado. Quando o extrato de *L. albus* foi administrado simultaneamente com DMH, também foi observado redução de danos para as duas concentrações, enquanto que no tratamento contínuo houve uma redução total do dano para a menor concentração. Quando o extrato foi administrado, após a exposição ao DMH, houve uma redução de danos somente para a concentração maior. No ensaio de FCA, o extrato de *L. albus* apresentou um potencial anticarcinogênico, por reverter e/ou inibir a progressão de lesões pré-neoplásicas de cólon dos grupos pré-tratados (nas duas concentrações), dos tratados simultaneamente (concentração menor), dos pós-tratados e dos grupos tratados continuamente (menor concentração). Na contagem diferencial de leucócitos, os extratos de *L. albus* foram capazes de promover uma imunomodulação na resposta imunológica. Com base nesses resultados podemos concluir que quando foi utilizado as o extrato, equivalente ao maior número de sementes *L. albus* apresenta potencial genotóxico e mutagênico devendo ser utilizado com cautela, além do que não apresentaram potencial hiperglicêmico, o que deve ser melhor avaliado pelo fato da sementes de *L. albus* serem utilizados principalmente por diabéticos com a finalidade de promover hipoglicemia, já para os níveis de colesterol, apesar das sementes de *L. albus* serem utilizadas para esta finalidade também não apresentaram melhora, porém não foi prejudicial para estes parâmetros.

Palavras chave: Tremoço branco; Lupanina; Focos de Criptas aberrantes (FCA); Micronúcleo; Contagem diferencial de leucócitos.

ABSTRACT

The use of medicinal plants is a very old practice, used by most of the people around the world. *Lupinus albus* (*L. albus*), popularly known as white lupine, has been used in popular medicine in form of raw seeds, as a regulator of blood glucose and cholesterol. Although literature describes that their isolated proteins have the this potential, there is no scientific information regarding the efficiency of their raw seeds. The aim of this study was to evaluate the possible genotoxic, antigenotoxic, mutagenic, antimutagenic, anticarcinogenic and carcinogenic effects, and also the immune modulatory potential of aqueous extract of raw seeds of *L. albus*, by means of bone marrow micronucleus, aberrant crypt foci in colon, leukocyte counting, blood glucose and serum cholesterol levels of mice *Mus musculus*, as well as to determine and quantify alkaloids and fatty acids of these extracts, by gas chromatography. The effects of concentrations equivalent to 3 seeds/day (as used in popular medicine) and 9 seeds/day were evaluated in mice. Chemical analysis of the extract showed the presence of the alkaloid lupanine and oleic, linoleic, palmitic and stearic fatty acids. However, according to biochemical assays, it was not possible to observe hypoglycemic effects of *L. albus* in both followed protocols. It was observed that cholesterol levels showed an improvement in the protocol using DMH. No cytotoxic effects were observed in the MN assay in bone marrow, but genotoxic and mutagenic effects were recorded in highest concentration of the tested extract. Antigenotoxic and antimutagenic effects were also observed, demonstrating a preventive action for the two concentrations tested due to the promotion of harm reduction for pre-extract treatment. When the extract of *L. albus* was administered simultaneously with DMH, a reduction in damage was recorded to both concentrations, while in the continuous treatment, a reduction in total damage to the lower concentration was observed. When the extracts were administered after exposure to DMH, there was only a reduction of damage in the highest concentration. Results on FCA assay, showed an anticancer potential of *L. albus*, once there was a reversion and/or inhibition in the progression of pre-neoplastic lesions of the colon in pretreated (both concentrations), treated simultaneously (lower concentration), post-treated and treated continuously (lower concentration) groups. In leukocyte counting, *L. albus* were able to promote an immune response in immunomodulation.

Keywords: White lupine; Lupanine; Aberrant Crypt Foci (FCA), Micronucleus, Differential leukocyte count; Alkaloids.

LISTA DE ABREVIACÕES

DM	Diabetes Mellitus
DMH	1,2- dimetilhidrazina
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FAP	Polipose Adenomatosa Familiar
FCA	Focos de Criptas Aberrantes
HDL	Lipoproteína de Alta Densidade
HNPCC	Câncer Colorretal Hereditário Não Polimatoso
LDL	Lipoproteína de Baixa Densidade
MN	Micronúcleo
MNPCEs	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
MNNCEs	Eritrócitos Normocromáticos Micronucleados
NCEs	Eritrócitos Normocromáticos
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCEs	Eritrócitos Policromáticos
QAs	Alcaloides Quinolizidínicos
VLDL	Lipoproteína de Muita Baixa Densidade

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	12
1.1. PLANTAS MEDICINAIS	12
1.1.1. Histórico.....	12
1.1.2. Fitoterapia.....	14
1.1.4. Compostos derivados do metabolismo das plantas	15
1.2. LUPINUS ALBUS.....	16
1.2.1. Constituintes das sementes de <i>L. albus</i>	16
1.3. DIABETES MELLITUS	19
1.4. CÂNCER.....	20
1.4.1. Câncer de cólon	21
1.5. USO DE ANIMAIS EXPERIMENTAIS.....	22
1.6. CITOTOXICIDADE	23
1.7. GENOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE	23
1.8. TESTE DE MICRONÚCLEOS EM MEDULA ÓSSEA DE CAMUNDONGOS.....	24
1.9. CARCINOGENICIDADE	24
1.9.1. Indução de carcinogenicidade de cólon	25
1.9.2. Focos de Criptas Aberrantes (FCA).....	26
1.10. ANTIMUTAGENICIDADE E ANTICARCINOGENICIDADE.....	26
1.11. QUIMIOPREVENÇÃO.....	27
1.12. O SANGUE	28
1.12.1. Coleta de Sangue.....	28
1.12.2. Sistema imune.....	29
1.12.3. Diferenciação dos leucócitos.....	29
1.13. CONSIDERAÇÕES PRÉ - ANALÍTICAS E ANALÍTICAS.....	31
2. OBJETIVOS	33
3. MATERIAL E MÉTODOS	34
3.1. MATERIAL	34
3.1.1. Material vegetal	34
3.1.2. Agentes químicos.....	34
3.1.3. Animais experimentais	34
3.2. MÉTODOS.....	35
3.2.1. Preparo dos extratos aquosos de <i>L. albus</i>	35
3.2.2. Extração dos alcaloides para cromatografia gasosa	35
3.2.3. Extração dos ácidos graxos para cromatografia gasosa	35
3.2.4. Identificação da presença de flavonoides.....	36
3.2.5. Identificação da presença das saponinas	36
3.2.6. Delineamento Experimental.....	36
3.2.6.1. Grupos Controles.....	36
3.2.6.2. Grupo de Avaliação do Potencial Citotóxico, Genotóxico e Mutagênico do <i>L. albus</i>	37
3.2.7. Bioensaios e Análises bioquímicas	41
3.2.8. Análises dos resultados.....	43

3.2.8.4. Análises estatísticas	44
4. RESULTADOS	45
ARTIGO 1- Avaliação do potencial antiglicêmico e anticolesterolêmico e quantificação de alcaloides e ácidos graxos do extrato aquoso de <i>lupinus albus</i>	45
ARTIGO 2- Avaliação dos efeitos do extrato aquoso de sementes de <i>l. albus</i> sobre a carcinogênese colorretal, níveis de glicemia e colesterol e resposta imunológica de camundongos <i>mus musculus</i>	45
ARTIGO 3- Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos, antigenotóxicos e antimutagênicos do <i>lupinus albus</i> por meio de ensaio do micronúcleo (mn) em medula óssea de camundongos <i>mus musculus</i>	45
6. CONCLUSÕES GERAIS	125
7. REFERÊNCIAS GERAIS	126

1. INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1. Plantas medicinais

1.1.1. Histórico

A OMS define planta medicinal como sendo todo e qualquer vegetal que possui, em um ou mais de seus órgãos, substâncias que possam ser utilizadas para fins terapêuticos. Pesquisas nesta área têm demonstrado que o homem pré-histórico aprendeu com os animais a distinguir as plantas comestíveis e aquelas que podiam ajudá-lo em suas enfermidades (CASTRO; CHENALLE, 1995; DIAS et al., 1995; BENDAZZOLI, 2000). Desta forma, a utilização de produtos naturais com fins medicinais nasceu com a humanidade, sendo uma das práticas mais antigas utilizadas pelo homem para cura, prevenção e tratamento de doenças (ANDRADE et al., 2007).

No século XIX, o conhecimento científico de elementos químicos foi suplantado pela química experimental, que permitiu a síntese de novas substâncias orgânicas. Esse foi um dos fatores determinantes para a revolução industrial e tecnológica, que desencadeou a produção acelerada de novos medicamentos e, à medida que derivados mais puros e concentrados de plantas se tornaram disponíveis, os médicos priorizaram os fármacos sintéticos e passaram a desconsiderar o papel importante da fitoterapia (BRATMAN, 1998; SIMÕES et al., 2001).

Mesmo com o uso de substâncias sintéticas para fins terapêuticos, a utilização de plantas medicinais ultrapassou todas as barreiras durante o processo da evolução tecnológica, estando ainda muito presente nos dias atuais. Esta prática é amplamente utilizada por grande parte da população mundial, como fonte de recurso terapêutico disponível e eficaz (SANTOS, 2005).

As plantas medicinais são utilizadas, na maioria das vezes, com base no conhecimento popular, sem qualquer respaldo científico sobre as suas propriedades farmacológicas e toxicológicas. Muitas vezes, as propriedades farmacológicas anunciadas não encontram validação científica, por não terem sido investigadas ou comprovadas em testes pré-clínicos e clínicos. Além disso, verifica-se também um tênue conhecimento a respeito dos constituintes responsáveis pela atividade farmacológica, ou de suas interações, que podem envolver inúmeras moléculas (TUROLLA; NASCIMENTO, 2006). Como os vegetais são organismos que apresentam grandes quantidades de princípios ativos com ação farmacológica, eles merecem um destaque especial, principalmente se considerarmos aqueles convencionalmente utilizados na alimentação humana, pelas propriedades nutricionais que

apresentam, tais como os altos teores de vitaminas e sais minerais, elementos indispensáveis para todos os organismos (WAGNER, 2003).

Tem havido um interesse cada vez maior em se desenvolver pesquisas que avaliem as características fitoquímicas das plantas medicinais, na intenção de se identificar a presença dos compostos e grupos químicos biologicamente ativos (FALKENBERG; SANTOS; SIMÕES, 1999). A avaliação fitoquímica é responsável pelo estudo e análise de compostos secundários e a descoberta das funções que estes compostos desempenham nas plantas e em organismos eventualmente expostos a eles.

Estudos com plantas medicinais são responsáveis por inúmeras e importantes descobertas na terapêutica. O desenvolvimento crescente nessa área se deve a vários fatores, destacando a participação, cada vez maior, de profissionais e de indústrias que buscam cooperação acadêmica na investigação científica dos produtos de origem vegetal (CALIXTO, 2000; RATES, 2001). Entretanto, poucas plantas foram avaliadas cientificamente quanto às suas atividades biológicas, sobretudo a respeito da sua segurança e eficácia para uso medicinal (WHO, 1999). Segundo, Ohlweiler (2007), das 274 mil espécies botânicas conhecidas no mundo até a década de 90 do século passado, somente 1% foi estudada quanto a sua composição química. Alguns dos compostos vegetais já foram identificados como mutagênicos e carcinogênicos, a exemplo de alguns flavonoides, hidrazinas, alcaloides e quinonas (PEREIRA, 1992). Por outro lado, as plantas podem conter substâncias antimutagênicas, como os betacarotenos, o ácido ascórbico (BOREK, 1996), flavonoides e folatos. Além disso, algumas plantas possuem uma longa história de uso no tratamento de câncer. Muitos compostos obtidos de vegetais podem agir como protetores de processos carcinogênicos, em humanos, inibindo os estágios de iniciação, promoção ou progressão tumoral (EDENHARDER et al., 1993).

Nas últimas décadas, houve um crescente interesse pelo uso de plantas medicinais e de seus respectivos extratos na terapêutica, constituindo, em certas circunstâncias, como um cuidado primário à saúde ou como um complemento terapêutico compatível com a medicina convencional. Desta forma, o uso de plantas na medicina alternativa deve ocorrer somente quando houver garantia de segurança, em relação aos seus efeitos tóxicos, e conhecimentos suficientes sobre os efeitos secundários, como as interações, contraindicações, mutagenicidade, dentre outros. Desta forma, antes da indicação de um fitoterápico novo, devem ser realizados ensaios farmacológicos e de experimentação clínica que demonstrem a eficácia do produto (ARAÚJO et al., 2007).

Com o desenvolvimento da fitoterapia, houve também o aumento do interesse em aprofundar os conhecimentos sobre as propriedades das plantas (FOGLIO et al., 2006). Estudos sobre a medicina popular vêm merecendo uma atenção especial, devido ao contingente de informações e esclarecimentos que este tem oferecido à ciência. O conhecimento de ações fitoterápicas tem reintroduzido os medicamentos de origem vegetal de maneira sistemática e crescente, na profilaxia e tratamento de doenças, ao lado da terapêutica convencional (FRANÇA et al., 2008). Os estudos biotecnológicos e o melhoramento genético dessas plantas podem oferecer vantagens, uma vez que torna possível obter uniformidade e qualidade, fundamentais para a sua eficácia e segurança (CALIXTO, 2000). Mesmo assim, as pesquisas científicas que visam a validação do uso de plantas são recentes e as práticas populares, relacionadas ao seu uso, são o que muitas comunidades têm como alternativas viáveis para o tratamento de doenças (PINTO et al., 2006).

Inúmeros estudos científicos vêm sendo realizados com a intenção de validar as informações populares referentes ao uso de plantas medicinais. Podemos mencionar o atual e intenso interesse que tanto os cientistas como as indústrias farmacêuticas têm em desenvolver pesquisas com o objetivo de descobrir novos princípios ativos e também descobrir novas atividades farmacológicas de substâncias já conhecidas e obtidas das plantas (GURIB-FAKIM, 2006).

1.1.2. Fitoterapia

Segundo Eldin e Dunford (2001), a fitoterapia pode ser definida como o estudo e a aplicação dos efeitos terapêuticos de substâncias vegetais com finalidades farmacológicas e de seus derivados. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) nº 48/2004 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) descreve que fitoterápicos são medicamentos preparados exclusivamente com plantas ou parte de plantas medicinais sejam elas raízes, cascas, folhas, flores, frutos ou sementes, que possuem propriedades reconhecidas de cura, prevenção, diagnóstico ou tratamento sintomático de doenças, validadas em estudos etnofarmacológicos, documentações tecnocientíficas ou ensaios clínicos de fase 3 (avaliação da substância comparada com o padrão já existente, testadas em voluntários).

É sabido que de cada quatro produtos vendidos nas farmácias, um é fabricado a partir de materiais extraídos de plantas ou de estruturas químicas derivadas desses vegetais. Porém, com a produção de fármacos via síntese química e a ausência de comprovação científica da eficácia das substâncias de origem vegetal, aliada às dificuldades de controle químico, físico-químico, farmacológico e toxicológico dos extratos vegetais até então utilizados,

impulsionaram a substituição destes produtos de origem natural por fármacos sintéticos (DI STASI, 1996; CALIXTO, 2000; OMS, 2000; RATES, 2001; TUROLLA; NASCIMENTO, 2006).

1.1.3. Toxicidade de plantas medicinais

A partir do século XIX, as plantas medicinais e os fitoterápicos vêm sendo utilizados como recursos terapêuticos suaves. Porém, como qualquer outro produto, por atuarem em processos biológicos, podem apresentar potencial tóxico, podendo assim apresentar contraindicações e efeitos colaterais, fatos estes que desmistificam o preceito de que o que é natural não traz grandes problemas à saúde humana (SCHENKEL et al., 2000; ELDIN; DUNFORD, 2001, NICOLETTI, 2007). A planta medicinal usada como medicamento deve ter sua ação comprovada e sua toxicidade avaliada cientificamente, como qualquer outro medicamento. Os testes de toxicidade em geral devem estabelecer relação dose-efeito satisfatório e permitir a relação causa-efeito (SIMÕES, 2001).

Como muitos materiais botânicos apresentam propriedades terapêuticas, muitas plantas são vendidas com a falsa promessa de cura para diversos males (BENDAZZOLI, 2000), o que pode provocar riscos de intoxicação, piora da doença, entre outros prejuízos ao usuário (ARNOUS et al., 2005; CHUNG et al., 2005; MACIEL et al., 2005).

Um perigo já evidenciado na população humana é a automedicação, que inclui o uso de plantas medicinais sem estudos, que pode gerar uma série de riscos, e levar a uma complicação no diagnóstico e, conseqüentemente, à saúde do usuário (ARNOUS et al., 2005). Diante da utilização indiscriminada de produtos naturais, ficam evidentes os vários perigos sobre efeitos adversos que estes compostos podem promover, quando associados a outros fármacos, ou mesmo com outros fitoterápicos (BOTSARIS; MACHADO, 1999; ARNOUS et al., 2005; CHUNG et al., 2005).

1.1.4. Compostos derivados do metabolismo das plantas

As substâncias essenciais à vida de uma planta são produzidas pelo seu metabolismo primário, tais como os carboidratos, lipídeos, aminoácidos, vitaminas e ácidos nucleicos, todos com funções bem definidas para a manutenção das suas atividades vitais (YEOH et al., 1979; SANTOS, 1996). Porém, as plantas também possuem compostos que não são essenciais à sua sobrevivência, mas que lhes conferem algumas vantagens adaptativas (FUMEGALLI et al., 2008) e conseqüentemente sua melhor sobrevivência (SANTOS, 1999). Os compostos produzidos pelo metabolismo secundário apresentam um amplo valor nas interações entre a

planta e seu ecossistema, exercendo vários papéis, tais como proteção, defesa, atração de polinizadores e de dispersores de suas sementes, dentre outros (SANT'ANA et al., 2002; SIMÕES et al., 2004). Existem três grandes grupos de compostos secundários: os alcaloides, os terpenos e os compostos fenólicos.

1.2. *Lupinus albus*

É conhecido popularmente como tremçoço branco, é uma planta anual, herbácea, adaptada a climas temperados e subtropicais, pertencente à família Fabaceae e ao gênero *Lupinus* sp. As espécies mais cultivadas são: *L. albus*, *L. angustifolius*, *L. luteus*, *L. mutabilis* e *L. polyphillus*. (AGRO PASTO SEMEAR; LUP INGREDIENTS).

1.2.1. Constituintes das sementes de *L. albus*

A cultura de *L. albus* é feita por 3 fatores principais: são utilizados na alimentação de ruminantes; usados como adubo verde; e usado na nutrição humana pela sua alta quantidade de proteína e conteúdo oleico (HUYGHE, 1997; FALUYI et al., 2000).

1.2.1.1. Proteína

L. albus é rico em proteínas, tendo um teor proteico de 30 a 40% do conteúdo total das sementes (KAHATTAB et al., 2009), quantidade esta maior que a encontrada em outras leguminosas (LAMPART-SZCZAPA, 2001). Suas proteínas apresentam propriedades medicinais, onde se destaca segundo Orestano (1940), a atividade antiglicêmica. Scarafoni et al., (2007) observaram que a proteína γ -conglutina representa 5% das proteínas totais das sementes de *L. albus*. Embora esta proteína tenha sua função desconhecida, devido a sua semelhança estrutural com a proteína Bg7S da soja, foi atribuída a ela a característica de se ligar à insulina (HANADA; HIRANO, 2004). Assim, a γ -conglutina se tornou uma séria candidata como hipoglicemiante e, por isso, mais investigada do ponto de vista molecular e metabólico. Os estudos *in vitro* da γ -conglutina isolada revelaram seu poder de ligação com a insulina e, em ensaios de atividade biológica realizados em ratos, foi demonstrado que ela reduziu os níveis de glicemia, de modo semelhante ao fármaco metformina® (MAGNI et al., 2004).

1.2.1.2. Ácidos graxos

L. albus contém triglicerídeos caracterizados por um teor elevado de ácido oleico (cerca de 44%), ácido linoleico (cerca de 36%). O alto teor de ácidos graxos poli-insaturados

é um importante requisito para uma boa dieta alimentar. Entre os ácidos saturados do *L. albus*, o mais importante é o ácido palmítico (cerca de 12%) (FELDHEIM 1991).

1.2.1.3. Fibras

A casca das sementes de *L. albus*, contém 95% de fibra, onde 77 % delas são fibras insolúveis (FELDHEIM; WISKER, 1986). As fibras são constituídas, principalmente, por celulose, xilose e ácido urônico, tendo uma composição muito parecida com a da casca da soja (FELDHEIM, 1994). Segundo Feldheim (1999), as sementes são ricas em oligossacarídeos não digeríveis pelo nosso organismo que, como as fibras, irão influenciar na digestão, atuando na redução da absorção dos açúcares e do colesterol e ajudando na redução do peso corporal.

Os efeitos dos oligossacarídeos e polissacarídeos estão relacionados com a redução dos níveis de colesterol sanguíneo e a diminuição do risco de desenvolvimento de câncer, devido à de três fatores: 1. Capacidade de retenção de substâncias tóxicas ingeridas ou produzidas no trato gastrointestinal durante processos digestivos; 2. Redução do tempo do trânsito intestinal, que promove uma rápida eliminação do bolo fecal; 3. Pouco contato do tecido intestinal com substâncias mutagênicas ou carcinogênicas, devido ao trânsito rápido pelo intestino, levando a formação de substâncias protetoras pela fermentação bacteriana dos compostos da alimentação (KAY, 1978). Dentre a prevenção de cânceres, podemos citar os de mama (COHEN, 1999; WILLETT, 2001). Isso sugere que um aumento no consumo de fibras, ou seja, frutas, vegetais e grãos integrais, podem reduzir o risco deste tipo de câncer (PRENTICE, 2000).

Dentre os possíveis mecanismos de ação que vêm sendo sugeridos, o mais provável é o que envolve a redução de estrogênios bioativos no sangue. Dietas ricas em fibras estão associadas com a alteração da flora intestinal que atua na regulação da recirculação enterohepática de estrogênios e levando a quantidade menor de estrogênio excretado (COHEN, 1999).

1.2.1.4. Isoflavonóides

As sementes de *L. albus*, acumulam vários isoflavonóides. Algumas isoflavonas atuam como estrógenos, podendo ligar-se a receptores de estrogênio ou a outros receptores de hormônios sexuais (JURY et al., 2000). Como exemplo de isoflavona presente nas sementes de *L. albus* está a genisteína sendo ela capaz de mimetizar a estrutura do estradiol. Wink (2005) testou diferentes extratos de sementes de *Lupinus sp*, quanto à sua capacidade de se

ligar aos receptores de estrógeno, e observou que extratos etanólicos de *L. albus*, devido ao seu conteúdo de isoflavonas, exibiam uma atividade estrogênica semelhante a do tamoxifeno. O estudo revelou que a genisteína apresentou capacidade de inibir a tirosina, responsável pela ativação de genes responsáveis pela divisão celular, associada a alguns tipos de tumores, principalmente os linfomas.

1.2.1.5. Vitaminas e minerais

Quando comparado a outras leguminosas, o *L. albus* é pobre em vitaminas, embora tenha uma boa fonte de vitaminas do complexo B. Para cada 100g de *L. albus* é encontrado 4 mg de niacina, 0.5 mg de tiamina, 0.4 mg de riboflavina, carotenóides e tocoferóis responsáveis pela coloração amarelada do óleo.

A composição mineral de *L. albus* é praticamente igual a das outras leguminosas, com excessão o cálcio que é mais baixo, e do manganês que é encontrando em quantidade muito elevada, podendo atingir de 83.5 a 143 mg. Também é rica em ferro e zinco (TRUGO et al., 2003).

1.2.1.6. Fatores antinutricionais

Alguns componentes encontrados em produtos naturais podem apresentar atividades biológicas, derivadas de suas propriedades nutricionais. Porém, essas propriedades podem ser indesejadas para nutrição humana e animal. Quando isso ocorre, dizemos que o produto natural apresenta propriedades antinutricionais. Destacamos abaixo algumas propriedades antinutricionais.

1.2.1.7. Fitatos

L. albus, apresenta baixas quantidades de fitatos (aproximadamente 0.8 mg para cada 100 g) que poderia levar a uma diminuição na absorção de minerais (HILL, 1977).

1.2.1.8. Saponinas

As saponinas são substância presente em diferentes classes de plantas, especialmente nas leguminosas. Sua presença nos alimentos foi considerada prejudicial quando consumida com frequência, podendo promover retardo de crescimento e diminuição na absorção de nutrientes. Porém há estudos que relatam efeitos benéficos, como redução de colesterol e atividade anticarcinogênica (HILL, 1977).

1.2.1.9. Lectinas

Segundo Pusztai e Bardocz (1996), as lectinas são moléculas biologicamente ativas, consideradas promissoras sob o ponto de vista farmacológico, apesar de também apresentar efeitos negativos sobre os organismos. Experimentos realizados com animais expostos a estas substâncias mostraram que elas podem induzir hiperplasia no intestino delgado, alterações da flora intestinal, atividade imunomoduladora, interferência em secreções hormonais e acesso à circulação sistêmica, o que limita o seu uso direto na alimentação (PRYME et al., 1998).

1.2.1.10. Alcaloides

Um dos fatores limitantes para o consumo de *L. albus* é a presença de alcaloides tóxicos presentes em várias espécies do gênero *Lupinus* (WINK, 2005). Estes compostos conferem sabor amargo ao vegetal, restringindo o seu uso direto na alimentação. A eliminação dos alcaloides das sementes de tremçoço pode ser feita por lavagem em água (demolhagem), pois os alcaloides são hidrossolúveis (HILL, 1977).

1.2.1.10.1. Alcaloides quinolizidínicos (QAs)

Os alcaloides quinolizidínicos que estão presentes no *L. albus* em maior quantidade são a lupanina e a esparteína (PAOLISSO et al., 1985; KÖRPER et al., 1998). Estes alcaloides, assim como o alcaloide 13-hidroxilupanina e 17-oxilupanina, são responsáveis pela redução dos níveis de glicose no sangue, promoção de inibição dos canais de K^+ e Na^+ no pâncreas e aumento da secreção de insulina, de modo semelhante ao fármaco glibenclamida® (GARZIA-LOPEZ et al., 2004).

1.3. Diabetes Mellitus

O Diabetes Mellitus (DM) é uma das doenças atuais de maior incidência no mundo, com cerca de 150 milhões de pessoas portadoras deste mal. Estima-se que em 2025 existam cerca de aproximadamente 300 milhões de pessoas diabéticas no mundo. O estilo de vida sedentário, o consumo de dietas com alto valor energético, a obesidade e os fatores genéticos têm contribuído para o crescente número de pessoas portadoras de diabetes (KING et al., 1998; PEPATO et al., 2001).

O DM pode ser definido como uma complexa desordem metabólica crônica de impacto significativo na saúde, como na qualidade e expectativa de vida. Esta desordem ocorre por uma deficiência total ou parcial na produção de insulina das células B das ilhotas de Langerhans localizadas no pâncreas.

O grau de deficiência do hormônio insulina é que define o tipo de diabetes. Dentre os tipos de diabetes temos: o DM tipo 1, cujos portadores são dependentes de insulino-terapia; o DM tipo 2, que pode ser, muitas vezes, controlado por uma alimentação balanceada, que é também conhecido como o diabetes da maturidade, pois geralmente acomete indivíduos acima de 40 anos, com instalação progressiva, e que também tem como agentes causadores os fatores genéticos e ambientais (WAJCHENBERG, 1992; DEFRONZO, 2004).

O diabetes é uma doença caracterizada pelo nível elevado de glicose no sangue, resultantes da deficiência da secreção e/ou ação da insulina, o que leva a anormalidades no metabolismo de carboidratos, lipídeos e proteínas, com complicações que podem ser agudas ou crônicas, como a cetoacidose, macro e microangiopatias, retinopatia, nefropatia, infecções recorrentes, úlceras nas extremidades inferiores, que podem levar a amputações de membros e à hiperglicemia, além de coma e morte. É marcada pela poliúria, perda de peso, polifagia e visão turva, cujas complicações geralmente são as principais causas de morte em pacientes diabéticos não tratados (AMERICAN DIABETES ASSOCIATION, 2008).

As Diretrizes da Sociedade Brasileira de Diabetes (2007) preconizam que o tratamento desta doença é feita por medidas não-farmacológicas (principalmente o controle da dieta) e farmacológicas, as quais incluem primeiramente o uso de hipoglicemiantes orais e, nos casos mais graves, reposição com insulina exógena. A concentração elevada de glicemia promovem anormalidades metabólicas, como excessiva lipogênese e hiperglicemia por resistência a insulina e deficiência orgânica das células pancreáticas, levando, muitas vezes, a uma elevação dos ácidos graxos livres no plasma, com aumento da secreção de VLDL (lipoproteína de muito baixa densidade) pelo fígado, envolvendo liberação extra na secreção de triglicérides e colesterol, o que pode levar a um aumento dos níveis de colesterol proporcionalmente à hiperglicemia (SKYLER, 2004).

1.4. Câncer

A carcinogênese é um processo complexo que, provavelmente, envolve uma série de mudanças genéticas e epigenéticas que ocorre em níveis morfológicos, celulares e moleculares. Ela pode ser sub-dividida em três estágios principais: iniciação, promoção, progressão. (PITOT, 2007; VICENTI; GATENBY, 2008).

A iniciação pode ser caracterizada por alterações na sequência de bases do DNA celular, provocada pela exposição a um agente carcinógeno químico, físico ou biológico. Esta interação pode levar a mutações em genes controladores do ciclo celular, apoptose e diferenciação, levando a um desequilíbrio, onde as células sobreviventes ao estímulo

mutagênico são denominadas de iniciadoras (PITOT, 2007; VICENTI; GATENBY, 2008). Na etapa de promoção, as células iniciadoras se multiplicam, formando lesões pré-neoplásicas sobre estímulos promotores. O agente carcinógeno promotor age de forma a selecionar as células iniciadoras e, dessa forma, ocorre a expansão clonal das mesmas, levando a um acúmulo de mutações e aumentando a instabilidade genética desta população celular (PITOT, 2007, VICENTI; GATENBY, 2008). Na etapa de progressão, as células têm alto grau de anaplasia, desequilíbrio entre proliferação celular e apoptose e autossuficiência. Quando essas células invadem vasos sanguíneos e linfáticos, alcançam tecidos distantes do hospedeiro, formando sítios de metástases. Com as metástases, as células malignas se espalham para diversos órgãos do paciente, competindo por espaço e nutrientes com as células saudáveis, vindo a comprimir vasos sanguíneos, acarretando em falência desses órgãos e levando o paciente a óbito (PITOT, 2001, 2007; VICENTI; GATENBY, 2008).

1.4.1. Câncer de cólon

No Brasil, segundo as estimativas de 2012, haverá aproximadamente, 518.510 casos novos de cânceres diagnosticados em 2013, sendo o câncer de cólon um dos 5 tipos de maior incidência. Esses índices também apontam que para o sexo masculino, a cada 100 mil novos casos de câncer, 14 mil sejam de cólon e reto e, para o sexo feminino a cada 100 mil novos casos, sejam para este tipo de câncer 16 mil. No mundo, o câncer de cólon é o terceiro tipo mais comum entre os homens, com cerca de 663 mil casos novos em 2008, e o segundo entre as mulheres, correspondendo para o mesmo ano 570 mil novos casos, sendo que 60% desses novos casos ocorrem em países desenvolvidos (INCA, 2012)

Aproximadamente 20% de todos os casos de câncer de cólon são considerados hereditários, podendo ser divididos em tumores de origem na Polipose Adenomatosa Familiar (FAP) e no Câncer Colorretal Hereditário Não Poliposo (HNPCC). Os mais frequentes, contudo, são os casos de câncer não hereditários resultantes da exposição à carcinógenos ou fatores ambientais de risco (ROSSI, 1998; STRACHAN, 1999).

O intestino grosso é formado por segmentos de cólon e reto, e tem função de absorver a água que é ingerida junto com os alimentos e transformar a massa da substância ingerida, e não aproveitada pelo organismo, em fezes, para então ser eliminada. Esses dois segmentos são semelhantes, por isso, os tumores que acometem estes locais são chamados de cânceres colorretais e tratados como uma mesma doença (KUMAR et al., 2002). Sendo assim o câncer colorretal pode iniciar-se tanto no cólon quanto no reto, cujos locais são os mais frequentes de neoplasias primárias, podendo ter caráter benigno (adenomas) e malignos

(carcinomas ou mais conhecido como adenocarcinoma) (CARLI, 2011). A transformação neoplásica da mucosa colônica normal em um adenoma e, posteriormente, em um adenocarcinoma, envolve uma série de alterações genéticas e eventos progressivos que ficou conhecida como sequência adenoma-adenocarcinoma (FEARON; VOLGESTEIN, 1990). O desequilíbrio fisiológico e cíclico da renovação epitelial (proliferação e morte celular) resulta em doenças neoplásicas no epitélio intestinal, onde o aumento na proliferação celular é considerado o evento celular mais precoce da carcinogênese de cólon (CAMPLEJOHN et al., 2003).

A maioria desses tumores tem sua iniciação nos pólipos, formações não cancerosas que podem crescer na parede interna do intestino grosso. Porém, podem aparecer como tumores carcinóides do cólon e do reto, tumores de estroma gastrointestinal e linfomas, podendo atingir a mucosa através da parede muscular do intestino. O tumor pode sofrer metástase e ir para os linfonodos mais próximos, através da invasão dos vasos linfáticos, e para o fígado, através da veia porta, além de poder apresentar metástase em outros órgãos como pulmões, cérebro e ossos (JUCÁ, et al., 2008).

1.5. Uso de animais experimentais

Os animais de laboratório são utilizados em pesquisas da área biomédica, sendo imprescindíveis para o desenvolvimento de muitos estudos das ciências biológicas e das ciências da saúde, por responderem satisfatoriamente a efeitos de agentes com atividade biológica, importante para avaliação na área médica (PAKES, 1984; DE LUCCA et al., 1996; ANDRADE et al., 2002; MAJEROWICZ, 2005; SALGADO, 2010).

A aplicação de modelos animais é muito diversificada, pois depende do objetivo do estudo e da própria área de investigação (SVENDESEN; HAU, 1994). Para a obtenção de resultados experimentais confiáveis, deve-se primeiro procurar protocolos experimentais que indiquem um modelo experimental adequado, o número de indivíduos necessários para a experimentação e os procedimentos experimentais adequados ao tipo de estudo a ser realizados (MANN et al., 1991; BOTTING; MORRISON, 1997; GILIOLI, 2003; FERREIRA et al., 2005). Russel e Burch (1959) salientam, como uma prática de bons princípios humanitários da experimentação animal, o uso do menor número possível de animais, a substituição, sempre que possível, do modelo animal por modelos alternativos e o aprimoramento das técnicas de pesquisa, visando minimizar o sofrimento do animal (ANDRADE et al., 2002; NATIONAL RESEARCH COUNCIL, 2008).

As espécies de roedores, como ratos e camundongos, começaram a ser consideravelmente utilizados em experimentação no século passado, devido à facilidade de acompanhamento das diferentes fases do desenvolvimento do animal, e das características próprias de cada experimento (DE LUCCA et al., 1996; GILIOLI, 2003). Atualmente, o camundongo *Mus musculus* é o animal mais amplamente utilizado para fins de ensino e pesquisa (ANDERSEN et al., 2004).

Eutanásia significa morte sem dor ou sofrimento. Para aplicação deste procedimento, diversas técnicas podem ser utilizadas, com o objetivo de não causarem sofrimento ao animal e não produzirem alterações que prejudiquem a interpretação de resultados (CARDOSO, 2002). Dentre os métodos utilizados para realização da eutanásia, estão os métodos físicos e químicos. Os métodos químicos são os mais indicados para este fim, sendo usado no procedimento que usa gases inalantes ou agentes farmacológicos não inalantes (ANIMAL WELFARE INSTITUTE, 1968). Os métodos físicos, como deslocamento cervical, só devem ser empregados quando outros métodos são considerados não adequados ao experimento, pela possibilidade de invalidar uma determinada informação da pesquisa, principalmente aquelas relacionadas com os processos bioquímicos do animal (OPS, 1968; CCAC, 1984; FIOCRUZ, 1993; DE LUCA et al., 1996).

1.6. Citotoxicidade

Um critério de avaliação da citotoxicidade seria analisar a relação entre os Eritrócitos Policromáticos (PCEs) e Eritrócitos Normocromáticos (NCEs) podem fornecer informações se uma determinada substância pode levar a uma diminuição da produção de novos PCEs. Se isto acontecer, a substância ou composto testado poderá ser considerada citotóxica (GALLAPUDI; MCFADDEN, 1995). Os PCEs, com o tempo perdem RNA e acumulam hemoglobina, evoluindo para NCEs, que são os eritrócitos maduros que chegam à corrente sanguínea (KRISHNA; HAYASHI, 2000).

1.7. Genotoxicidade e Mutagenicidade

A genotoxicidade ou toxicidade genética é uma especialidade da ciência que estuda a ação de qualquer agente físico, químico ou biológico sobre o material genético dos organismos. Os agentes genotóxicos são os que interagem com o DNA, promovendo alterações na sua estrutura e função.

Ensaio que detectam agentes genotóxicos permitem identificar substâncias que apresentam um potencial de risco à integridade do DNA de um organismo (RIBEIRO et al.,

2003; CHEN; WHITE 2004; OHE et al., 2004). É considerada genotóxico todo tipo de dano ao DNA, incluindo quebra no DNA, síntese não programada de DNA, trocas de cromátides irmãs, entre outros (DEARFIELD et al., 2002).

A mutação é uma alteração na estrutura do material genético que pode ser herdável ou transmitida para as gerações subsequentes que, como tal, constitui uma fonte de extrema importância para a variabilidade genética da população (BURNS; BOTTINO, 1991). Entretanto, em curto prazo, e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar a homeostase do desenvolvimento e a fisiologia de um organismo (ALBERTS, 2002). Existem poucos promotores que atuam por meio de mecanismos citotóxicos ou mutagênicos, sendo que a maioria envolve processos de inflamação, que é um importante evento associado à carcinogênese (BANNER et al., 1993).

1.8. Teste de Micronúcleos em medula óssea de camundongos

Dentre os testes de avaliação toxicológica, aceitos pelas agências internacionais e instituições governamentais, os testes de micronúcleos realizados em ratos e camundongos (teste *in vivo*) são amplamente recomendados para avaliação e registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram no mercado mundial. São testes extremamente aplicados em estudos toxicológicos preliminares, para a liberação de novas substâncias (RIBEIRO et al., 2003; VASCONCELOS et al., 2007; RUIZ et al., 2008; TAGLIATI et al., 2008; PAULO et al., 2009), uma vez que os resultados produzidos são considerados amplamente correlacionados com possíveis efeitos em humanos (MORITA et al., 1997).

O teste de micronúcleo é um método utilizado para avaliar a capacidade de substâncias induzirem danos cromossômicos em células de diferentes estágios de divisão na medula óssea (FENECH, 1997), sendo sua frequência estipulada por meio da contagem de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados ou Eritrócitos Normocromáticos Micronucleados (MNPCEs ou MNNCEs) e Eritrócitos Policromáticos (PCEs) ou Eritrócitos Normocromáticos (NCEs).

1.9. Carcinogenicidade

Alguns pesquisadores citam a existência de uma correlação direta entre a carcinogênese e a mutagênese promovida por agentes químicos, uma vez que a maioria dos carcinógenos químicos interage com o material genético. Sendo assim, muitos estudos trazem informações suficientes para sugerir que o câncer pode ser induzido por um evento

mutacional (AMES et al., 1983; VOGEL, 1982), o qual, em geral, é responsável pela ativação de proto-oncogenes e inativação de genes supressores tumorais (McKELVEY-MARTIN et al., 1998).

Os proto-oncogenes são genes funcionais ativos em células saudáveis, mas que são equivalentes a oncogenes carregados por alguns retrovírus. Em certos casos, mutações ou ativação aberrante dos mesmos, pode estar associada à formação de tumores. A ativação de um oncogene representa um evento em que um proto-oncogene celular é ativado inapropriadamente (LEWIN, 2001).

Os genes supressores tumorais são genes que quando ativos, inibem ou controlam o processo tumoral. Quando estes genes são inativados, induzem a tumorigênese. Uma mutação em um supressor tumoral pode representar uma perda de função em genes que normalmente impõem alguns limites ao ciclo celular ou ao crescimento celular (LEWIN, 2001). Alguns agentes químicos podem alterar tanto os genes supressores de tumores como os proto-oncogenes, alterando tanto o ciclo celular como o desenvolvimento do organismo. Porém, alguns agentes capazes de atuar na célula podem auxiliar na prevenção do câncer, pelo mesmo fato de causarem mutações nos proto-oncogenes e ou nos supressores tumorais já mutados (GRÜTER et al., 1990; WATERS et al., 1990).

1.9.1. Indução de carcinogenicidade de cólon

Os carcinógenos químicos diretos possuem atividades eletrofílica intrínseca, e os carcinógenos indiretos precisam sofrer modificações químicas no organismo, antes de se tornarem eletrofílicos ativos, sendo então denominados de protocarcinógenos (CARLI, 2011).

Os carcinógenos químicos agem no DNA causando mutações e estimulando a proliferação celular, podendo induzir tumores em órgãos específicos. O principal mecanismo dos carcinógenos é a formação de compostos covalentes com o DNA, que aumentam a probabilidade de ocorrerem erros durante a replicação celular, podendo inibir as atividades das enzimas reparadoras (ROSEMBERG, et al., 2009; CARLI, 2011).

O câncer de cólon pode ser induzido em roedores por diversos carcinógenos químicos diretos e indiretos (CARLI, 2011). A DMH (1,2-dimetilhidrazina) é um carcinógeno químico de ação indireta que se liga ao DNA (NEWELL; HEDDLE, 2004, TANAKA, 2009). A DMH é usada como agente carcinogênico completo, pois induz as etapas de iniciação e promoção e possui alta especificidade para o cólon de várias espécies de roedores (NEWELL; HEDDLE, 2004, TANAKA, 2009; FEMIA, 2010). É um dos carcinógenos mais utilizados em experimentação, devido à sua alta taxa de indução de tumores em um período curto de

latência, o que pode ser conseguido com uma dose única ou com uma série de pequenas doses semanais (KAMALEESWARI et al., 2006).

Sua ativação metabólica ocorre no fígado, via CYP 2E1, e seus metabólitos são transportados pelo sangue ou bile para o intestino grosso (principal alvo de sua ação) (TANAKA, 2009). Os produtos de metabolismo da DMH induzem a formação de adutos de grupos metil, que agem provocando mutações pontuais no DNA, separação aberrante de cromátides irmãs e indução de apoptose no cólon, aumentando a proliferação de colonócitos (NEWELL; HEDDLE, 2004). Existem muitas similaridades entre os tumores humanos e os induzidos pela DMH, como, por exemplo, a cinética da proliferação celular (TANAKA, 2009). Além disso, o modelo de câncer de cólon induzido pela DMH é considerado o mais indicado para se avaliar o potencial de um agente quimiopreventivo (CORPET; PIERRE, 2005).

1.9.2. Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Os Focos de Criptas Aberrantes (FCA) são lesões pré-neoplásicas consideradas marcadores do câncer de cólon e muito utilizados em estudos experimentais de quimioprevenção (CORPET; PIERRE, 2005; FEMIA, 2010). Essas lesões são encontradas no cólon de roedores tratados com carcinógenos químicos e também em seres humanos acometidos pela polipose ou câncer de cólon (PRETLOW, 1991; ALRAWI, 2006). As criptas aberrantes foram primeiramente descritas por Bird (1987), para cólon de roedores tratados com carcinógenos químicos. Elas podem ser identificadas na mucosa do cólon, como sendo criptas mais largas, espessas e mais escuras que as demais criptas intestinais, podendo ser únicas ou em forma de focos (TUDEK et al., 1989). Estas são observadas, com maior frequência, no cólon médio e distal, tanto em roedores como no homem, e são consideradas precursoras da carcinogênese de cólon (DI GREGORIO et al., 1997; RODRIGUES et al., 2002).

1.10. Antimutagenicidade e anticarcinogenicidade

O termo antimutagênico foi usado, originalmente, para descrever agentes que reduzem a frequência de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente do mecanismo de ação envolvido (WATERS et al., 1990). Atualmente, o termo pode ser usado para estudos e identificação de compostos naturais presentes na dieta humana, que podem prevenir danos genéticos induzidos por mutágenos e ou carcinógenos (HEDDLE et al., 1999; BOYLE et al., 2000; HANAUSEK et al., 2003; FERGUSON et al., 2004; HOENSCH;

KIRCH, 2005). Vários estudos têm demonstrado que substâncias endógenas advindas da alimentação, ou sintetizadas pelas células, exibem algum tipo de atividade inibitória para agentes mutagênicos naturais e artificiais (ODIN, 1997).

Os mecanismos de ação dos agentes antimutagênicos foram classificados em duas categorias, denominadas de desmutagênese e de bioantimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, atuam diretamente sobre os compostos que induzem mutações no DNA, inativando-os química ou enzimaticamente, inibindo a ativação metabólica de pró-mutágenos ou sequestrando moléculas reativas. Na bioantimutagênese, os antimutagênicos atuam ou sobre o processo que leva a indução de mutações ou sobre o reparo das lesões do DNA (KADA et al., 1978).

O descobrimento de produtos que reduzem a taxa de mutações, poderia levar a redução na incidência de câncer, pelo simples fato de aumentar o seu consumo na dieta (HAYATSU et al., 1988). Muitos estudos têm identificado um grande número de compostos com potencial antimutagênico e anticarcinogênico em alimentos, estando a maioria deles presente em alimentos de origem vegetal (KOHLMEIER et al., 1995; DE MARINI, 1998).

Frente ao exposto, os compostos com atividade antimutagênica ou anticarcinogênica, que sejam de fácil obtenção, são de grande relevância para a saúde pública, podendo se caracterizar em uma alternativa adicional para a redução das taxas de neoplasias (SUAHEYUN et al., 1997). Dados da literatura mostram, por exemplo, que dietas ricas em vegetais podem reduzir, significativamente, a incidência de câncer (STEINMETZ; POTTER, 1996). A prevenção do câncer e de outras doenças relacionadas pode ser realizada tanto por impedimento da exposição à mutágenos e carcinógenos reconhecidos, como pelo favorecimento do consumo de fatores protetores ou por fortalecimento dos mecanismos de defesa do organismo, tais como os bioquímicos e os fisiológicos (DE FLORA, 1998).

1.11. Quimioprevenção

A dieta desempenha um papel muito importante na prevenção do câncer. Dentre as estratégias estudadas, temos a ingestão de fatores de proteção, denominada de quimioprevenção (DE FLORA et al., 2001). A quimioprevenção investiga a capacidade de constituintes específicos, como vitaminas, minerais, fitoquímicos ou fármacos, em paralisar ou suprimir a iniciação e progressão da carcinogênese. Os alimentos comumente consumidos pelos seres humanos, particularmente os de origem vegetal, são fontes de muitos micronutrientes, que podem auxiliar na prevenção de doenças como o câncer (GREENWALD et al., 2001).

A quimioprevenção de danos no DNA tem se mostrado uma alternativa promissora na prevenção de doenças relacionadas às mutações, uma vez que o uso de estratégias que envolvem a redução ou a eliminação da exposição humana a alguns fatores de risco nem sempre é possível (RIBEIRO et al., 2006). O DNA sofre frequentemente, agressões por substâncias exógenas e endógenas, cujos efeitos sobre a célula podem ser reparados por sistemas enzimáticos. Embora esses sistemas sejam eficientes, algumas lesões, ou mesmo erros espontâneos que ocorrem na replicação do DNA, podem não ser reparadas, caracterizando-se assim em eventos mutacionais. Esse evento pode corresponder, por exemplo, à etapa de iniciação do processo carcinogênico (TUCKER; PRESTON, 1996; RAMEL, 1984).

1.12. O sangue

O sangue é um tecido conjuntivo fluido, produzido na medula óssea vermelha, cuja função é estabelecer contato entre as diversas partes do organismo, servindo como meio de transporte de substâncias essenciais à vida. Ele está contido em um compartimento fechado, o aparelho circulatório, que o mantém em movimento regular e unidirecional, devido, essencialmente, às contrações rítmicas do coração (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004).

1.12.1. Coleta de Sangue

Muitos experimentos realizados com camundongos usam amostras de sangue para o seu processamento. Atualmente, existe uma série de metodologias eficazes disponíveis para a realização de coleta de sangue em camundongos (HOOF, 2000). O Guide for the Care and Use of Laboratory Animals (1993) preconiza que é extremamente importante que as coletas de sangue sejam realizadas por pessoal qualificado, com habilidade na técnica de coleta a ser empregada e que saiba minimizar o estresse do animal.

Vários critérios são avaliados para selecionar o melhor método da coleta, conforme a análise a ser realizada, o volume total por amostra necessária, a frequência de amostragem e se o procedimento é terminal ou se o animal passará por recuperação. Em camundongos, esses critérios têm maiores consequências, devido a certas limitações que incluem o seu pequeno porte, o volume de sangue e a falta de vasos sanguíneos de fácil acesso (SCHNELL et al., 2002). As suas características hematológicas podem ser influenciadas por vários fatores, como linhagem, idade, sexo, espécie, anestesia utilizada na coleta, método de contenção e estresse (THRALL, 2004).

A hematologia básica envolve a análise da concentração, estrutura e funções dos elementos que compõem o sangue e seus produtos. Dentre os três maiores componentes do sangue, estão os glóbulos vermelhos (eritrócitos ou hemácias), glóbulos brancos (leucócitos) e plaquetas (trombócitos) (LEWIS et al., 2006). O sangue é uma das vias utilizadas pelo sistema imune para defender o organismo de invasões de diversos agentes (GOULART, 2006).

1.12.2. Sistema imune

O sistema imunológico tem como função proteger o organismo contra constantes ataques de agentes infecciosos, como vírus, bactérias, fungos e protozoários. A divisão celular em precursores linfóides e mielóides consiste, primeiramente na diferenciação de células do sistema imune. Os precursores linfóides originam os linfócitos T e B e as células Natural killers (NK), enquanto que os precursores mielóides originam os eritrócitos, plaquetas, monócitos, macrófagos, células dendríticas, neutrófilos, basófilos e os eosinófilos (WEISSMAN, 1994).

1.12.3. Diferenciação dos leucócitos

Os leucócitos participam dos processos imunes e inflamatórios e sua quantificação, em roedores, inclui a contagem total e diferencial. Os principais tipos de leucócitos avaliados durante a contagem diferencial são os linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos (HEDRICH, 2004; WEISS; WARDROP, 2010).

As células linfóides auxiliam na resposta imune inata do organismo, mas a maioria delas é responsável por mediar a imunidade adaptativa (TURGEON, 2005). Em camundongos, os linfócitos podem ser pequenos ou grandes, sendo que os primeiros possuem pouco citoplasma e núcleo excêntrico com cromatina condensada, enquanto que os segundos possuem citoplasma mais extenso. Os linfócitos compreendem de 70 a 80% da contagem diferencial de leucócitos em camundongos, podendo apresentar contagens acima de 80% em animais jovens (HEDRICH, 2004; WEISS; WARDROP, 2010).

Os neutrófilos apresentam a primeira linha de defesa contra a invasão de microrganismos, trauma nos tecidos ou algum sinal inflamatório como fagócitos circulantes e moduladores da resposta imune. Eles têm como mecanismo básico de ação, a fagocitose, e posterior destruição dos agentes estranhos, via mecanismos enzimáticos ou dependentes de oxigênio (SOUZA et al., 2006). Juntamente com os macrófagos, atuam de forma eficaz na ligação entre a resposta imune inata e adaptativa (SCOTT; KRAUSS, 2011). Em camundongos, estas células possuem citoplasma pálido com grânulos corados de rosa mais

fraco e núcleo tipicamente segmentado. Sua contagem em camundongos está entre 20 e 30% da contagem total dos leucócitos (HEDRICH, 2004; WEISS; WARDROP, 2010).

Os monócitos, juntamente com os macrófagos livres e fixados nos tecidos e células progenitoras na medula óssea, compõem os fagócitos mononucleares. Estas células são responsáveis pela fagocitose e destruição de bactérias e protozoários. A aderência dos monócitos à superfície bacteriana é a primeira etapa da ativação dessas células e início da resposta imunológica (BRANDT et al., 2003). Monócitos de camundongos são similares aos de outras espécies de mamíferos e possuem núcleo pleomórfico, podendo ser arredondado, recortado ou lobular e citoplasma extenso, frequentemente contendo vacúolos. Nesta espécie compreendem de 0 a 2% da contagem total dos leucócitos (HEDRICH, 2004; WEISS; WARDROP, 2010).

Os eosinófilos são células mediadoras da patogênese de muitos processos inflamatórios que, juntamente com os basófilos, estão relacionados com a resposta imune de infecções por helmintos e doenças alérgicas. Em resposta a estes diversos estímulos, os eosinófilos são recrutados da circulação para o foco da inflamação, onde modulam as respostas imunes por meio de uma série de mecanismos, sendo importantes na imunidade inata e também adaptativa (ROTHENBERG, 2006). Em camundongos, essas células têm citoplasma arredondado e, ocasionalmente, um núcleo em formato de anel que é parcialmente escondido pela presença de grânulos com tonalidade variando do laranja avermelhado a vermelho. Os grânulos são grandes, arredondados e de tamanho uniforme. Seu percentual em camundongos é de 0 a 7% da contagem total dos leucócitos (HEDRICH, 2004; WEISS; WARDROP, 2010).

Os basófilos são células idênticas aos mastócitos, com relação à composição mas funcionam de forma independente e são imunofenotipicamente distintas umas das outras, bem como de outras células hematopoiéticas. São granulócitos polimorfonucleados que produzem citocinas em defesa contra parasitos e também são responsáveis pela inflamação alérgica mediada pela imunoglobulina IgE (ABBAS et al., 2008). Apesar de serem bastante distintos, raramente são observados em esfregaços de sangue periférico. Os basófilos de camundongos possuem núcleo lobulado e citoplasma contendo grânulos roxos, grandes e arredondados, que podem ser numerosos ou não, chegando a obscurecer o núcleo da célula. Sua contagem em camundongos está entre 0 e 1% do total dos leucócitos (HEDRICH, 2004; WEISS; WARDROP, 2010).

1.13. Considerações Pré - analíticas e analíticas

Os testes laboratoriais avaliam as condições fisiológicas e o estado de saúde de um determinado indivíduo. Quando os resultados encontrados estão acima ou abaixo dos valores de referência, eles são considerados anormais, levantando ou confirmando a possibilidade de uma condição patológica. Muitas vezes, existem condições em que os resultados dos testes laboratoriais não se enquadram nos limites definidos como normais, embora o indivíduo não apresente uma condição patológica (VIEIRA, 2009). Em análises clínicas, o processamento de uma amostra biológica, obtida adequadamente para fins laboratoriais, é feito em três fases: pré-analítica, analítica e pós-analítica. Em cada etapa existem vários fatores de interferência, que podem provocar falsos resultados experimentais, de forma a comprometer a qualidade e a confiabilidade dos mesmos (PICARELLI, 2004).

Neste contexto, em roedores de laboratório, muitos fatores pré-analíticos podem afetar os parâmetros pesquisados, alterando, assim, a avaliação dos valores de referência (WEISS; WARDROP, 2010). Tais fatores incluem as particularidades do animal, o processo de coleta da amostra, bem como a sua manipulação. Na análise dos resultados, deve-se considerar estes fatores, tanto no momento do diagnóstico quanto no acompanhamento da resposta ao tratamento de uma doença. Dentre estes fatores, pode-se citar as variações fisiológicas relativas à dieta, ritmos biológicos, estresse, além dos problemas relacionados à coleta das amostras, como o tipo de material utilizado, as condições de manuseio, acondicionamento e as consequências na preservação física dos analitos (VIEIRA, 2009). Embora os procedimentos pré-analíticos sejam de fundamental importância para os resultados dos testes, os analíticos, incluindo o método (equipamentos, reagentes, calibradores, tipo de dados brutos e método do cálculo), o controle de qualidade e o critério de confiança, também devem ser avaliados. O mesmo método analítico deve ser utilizado para assegurar a comparação entre os valores de referência e os valores observados (BURTIS et al, 2008). Características da metodologia, como precisão, exatidão, sensibilidade analítica, linearidade, reprodutibilidade e potenciais interferentes devem ser conhecidos e, na medida do possível, estar sob controle restrito (FERREIRA; ANDRIOLO, 2008).

1.14. Relevância do tema

Contudo, ao contrário dos estudos já realizados com isolados proteicos e isolados de alcaloides os quais foram reportados efeitos benéficos para os organismos testados para o controle dos níveis de glicemia e colesterol, nosso trabalho estudou as sementes do *L. albus* como é utilizado pela população, tentando através da utilização do extrato aquoso uma maior

semelhança com ao consumo no uso popular, onde é possível observar a presença não apenas dos constituintes benéficos, mas também dos componentes antinutricionais, que podem conferir sérios riscos à saúde de seus consumidores, além de um efeito sinérgico, já que seus constituintes podem interagir entre si e apresentar diferentes respostas.

2. OBJETIVOS

Considerando que o tremoço branco (*L. albus*) é usado na medicina popular, por ser indicado como regulador de níveis de glicemia e de colesterol; que suas sementes consumidas cruas são tóxicas por apresentar propriedades antinutricionais, devido à presença de alcaloides e de inibidores de tripsina; por ainda não se ter qualquer avaliação das suas possíveis propriedades genotóxicas, mutagênicas, citotóxicas, carcinogênicas, antigenotóxicas, antimutagênicas e/ou anticarcinogênicas, este projeto teve por objetivo investigar os compostos fitoquímicos presentes nos extrato aquoso de sementes cruas do *L. albus*, através da cromatografia gasosa e avaliar o possível efeito sobre componentes celulares; avaliar seu potencial antiglicêmico e colesterolêmico; assim como avaliar seus efeitos sobre células sanguíneas, por meio de bioensaios *in vivo* realizados com o organismo teste camundongos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss.

Objetivos específicos:

- Investigar os compostos fitoquímicos dos extratos de *L. albus*, por meio de cromatografia gasosa;
- Avaliar o efeito dos extratos de *L. albus* em células sanguíneas, utilizando para esta avaliação o ensaio de contagem diferencial de leucócitos;
- Avaliar os níveis de glicemia, colesterol total, LDL, HDL e triglicérides do soro dos animais tratados com os extratos de *L. albus*, por meio de análises realizadas com kits bioquímicos;
- Investigar os possíveis efeitos citotóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos, mutagênicos e antimutagênicos, por meio do teste de micronúcleo em células de medula óssea de camundongos, utilizando para esta avaliação a análise de Eritrócitos Policromáticos (PCEs), Eritrócitos Normocromáticos (NCEs) e a frequência de micronúcleos (MN);
- Investigar os possíveis efeitos carcinogênicos e anticarcinogênicos colorretal, de *L. albus*, por meio do teste de focos de criptas aberrantes, utilizando para esta avaliação a análise do cólon dos animais tratados e análise de redução de danos;
- Analisar macroscopicamente os órgãos dos animais tratados com os extratos de *L. albus* para avaliar possíveis efeitos tumorigênicos.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Material

3.1.1. Material vegetal

3.1.1.1. Obtenção do Material Vegetal

As sementes da espécie *L. albus* (tremoço branco) foram adquiridas em comércio de grãos destinados a alimentação humana. Após a aquisição, as sementes foram devidamente armazenadas no Laboratório de Mutagênese da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) do Instituto de Biociências/Departamento de Biologia/Campus de Rio Claro, até a sua utilização nos experimentos.

3.1.2. Agentes Químicos

O agente químico utilizado para indução de micronúcleo e de carcinogênese colorretal dos grupos controle positivo e nos ensaios de antimutagenicidade e anticarcinogenicidade foi a 1,2-dimetilhidrazina (DMH; Sigma[®], CAS: n° 306-37-6) concentração de 20mg/kg, diluída em solução de EDTA (0,37mg/ml). A solução foi administrada aos animais pela via intraperitoneal (i.p), na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c).

3.1.3. Animais Experimentais

Foram utilizados, em cada tratamento 5 camundongos machos da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso inicial aproximado de 30 gramas, provenientes da empresa ANILAB[®]. Os animais permaneceram por todo período experimental no biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)- Campus de Rio Claro, Instituto de Biociências. A temperatura do ambiente foi mantida a 22±2°C e umidade relativa do ar a 55±5%, em ciclo claro e escuro de 12 horas. Os animais receberam água mineral e ração Nuvital[®] *ad libitum*, por todo período experimental. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação do Comitê de Ética em Uso animal (CEUA) do IB/UNESP-Rio Claro, Protocolo 6916/2010.

3.1.3.1. Eutanásia dos animais

Após o período experimental, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sem a utilização de meios analgésicos, devido ao fato da eutanásia química poder

induzir alterações nas respostas imunológicas (EVRARD, et al.,1997; PECAUT, et al., 2000) e, portanto, comprometer a fidelidade dos resultados obtidos nesta pesquisa.

3.2. MÉTODOS

3.2.1. Preparo dos extratos aquosos de *L. albus*

As sementes de *L. albus* foram trituradas em liquidificador, até ficarem com aspecto de farinha. Após trituração, a farinha foi misturada em água. Para o preparo da concentração de 0.5 mg/kg/dia, foi adicionado 0.075g da farinha de *L. albus* em 45 mL de água e para a concentração de 1.5 mg/kg/dia, foi adicionado 0.225g em 45 ml de água. Essas soluções foram submetidas à homogenização em “mixer”, por 1 minuto, para obtenção dos extratos aquosos. A preparação das farinhas foi realizada semanalmente e estas foram usadas para a preparação dos extratos no momento da administração dos mesmos para os camundongos. Pelo fato desses extratos aquosos poderem ser susceptíveis a degradação e a contaminação microbiana (SIMÕES, et al., 2004). As diferentes concentrações foram administradas aos camundongos, pelo método de gavagem, na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c).

Esses extratos foram preparados para uso no tratamento dos animais e para as extrações de alcaloides e ácidos graxos, destinados para análise em cromatografia gasosa.

3.2.2. Extração dos alcaloides para cromatografia gasosa

A porção lipídica dos extratos foram retirados em hexano, por duas vezes, e alcalinizado com hidróxido de amônia, para seguir a extração dos alcaloides em clorofórmio (pH > 10), processo também repetido por duas vezes. Após a extração, foi feita a lavagem do material com água, até que o pH atingisse a neutralidade. A seguir, o clorofórmio foi passado em uma coluna preparada com sulfato de sódio anidro e lã de vidro, para a retirada de qualquer vestígio de água decorrente da extração clorofórmica. Na sequência, os extratos foram injetados no GCMS- tempo real.

3.2.3. Extração dos ácidos graxos para cromatografia gasosa

Os ácidos graxos dos extratos foram extraídos em hexano, seguido de evaporação em chapa aquecida a 50°C. Após a evaporação total do hexano, foram adicionados 2 ml de metanol e 280 ul de ácido sulfúrico diluído em 10 ml de metanol. Para a hidrólise, foram adicionados 500 ul de hidróxido de potássio, sendo esta solução levada ao banho-maria a 60°C por 30 minutos. Para a esterificação, foi acrescentado 1 ml de ácido sulfúrico, permanecendo em banho-maria por mais 30 minutos, seguido de agitação com adição de 5 ml

de hexano. Após agitação, a solução foi submetida à decantação, para a separação das fases. O sobrenadante foi utilizado nas análises realizadas com o CGMS- tempo real, porque os ácidos graxos presos ao hexano ficam retidos nesta solução.

3.2.4. Identificação da presença de flavonoides

Para a análise de flavonoides, foi utilizado 1 ml dos extratos obtidos, nas duas concentrações, onde foi adicionado 4 ml de álcool etílico e 100 μ l de cloreto de alumínio diluído em metanol 2%.

3.2.5. Identificação da presença das saponinas

Para identificação da presença de saponinas, foram preparados os extratos e observada a presença de espuma persistente.

3.2.6. Delineamento Experimental

Os experimentos foram realizados com duas diferentes concentrações dos extratos aquosos de *L. albus* (0,5 mg/kg/dia e 1,5 mg/kg/dia), que equivalem, para camundongos, a 3 sementes/dia e a 9 sementes/dia para uso humano. Os ensaios foram realizados separadamente, para cada uma das concentrações. Os animais foram subdivididos em oito diferentes grupos experimentais: grupo controle negativo, controle positivo e grupos tratados com extratos aquosos de *L. albus*. Os experimentos foram realizados pela exposição de 5 animais para cada um dos diferentes ensaios e concentrações, totalizando 70 animais. Os animais foram submetidos ao tratamento por 12 semanas e 72 horas de recuperação, conforme protocolo sugerido por Mauro et al. (2008), como descrito no item 3.2.6.4:

3.2.6.1. Grupos Controles

3.2.6.1.1. Grupo de Tratamento Controle Negativo

Neste grupo, os animais receberam, durante as primeiras quatro semanas de experimentação, (via gavagem), 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c) de água mineral. Após essas quatro semanas, os animais receberam quatro doses de solução de EDTA (0,37 mg/ml) (via intraperitoneal- i.p), sendo 0,1ml/10g p.c por semana. Este procedimento foi adotado para provocar o mesmo estresse dos animais que receberam o agente indutor de mutagenicidade e carcinogenicidade (DMH), sendo uma dose por semana. Nas últimas quatro semanas receberam diariamente (via gavagem) água mineral.

As coletas de sangue periférico, a serem usadas para contagem diferencial de leucócitos, ocorreram após o período de 24, 48 e 72 horas de recuperação. Por todo o período experimental, os animais foram tratados com água mineral e ração Nuvital[®] *ad libitum*.

Após as 12 semanas e 72 horas de experimentação, foi realizada a coleta de amostra de sangue periférico, para a realização da contagem diferencial e análise bioquímica da glicemia, colesterol total, LDL, HDL e triglicérides. Na sequência, os animais foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e então realizada a coleta da medula óssea do fêmur, para a realização do ensaio do micronúcleo (MN) e coletado o intestino grosso, para a realização do ensaio de (FCA). Também foram coletados, após a eutanásia, todos os órgãos que foram devidamente, pesados e observados macroscopicamente, para a certificação da coloração e se havia indícios de presença de tumores. Estes órgãos foram devidamente armazenados, para possíveis avaliações histológicas futuras.

3.2.6.1.2. Grupo de Tratamento Controle Positivo

Neste tratamento, os animais receberam, (via gavagem) durante as quatro primeiras semanas, água mineral. Nas quatro semanas seguintes, quatro doses de DMH, (via i.p), sendo administrada uma dose por semana, na concentração de 20 mg/kg. Nos demais dias deste período foi administrado, (via gavagem), água mineral, até completar 12 semanas de tratamento. A alimentação, eutanásia e as coletas ocorreram conforme descrito no item 3.2.6.4.1.2.

3.2.6.2. Grupo de Avaliação do Potencial Citotóxico, Genotóxico e Mutagênico do *L. albus*.

3.2.6.2.1. Grupo de Tratamento com *L. albus*.

3.2.6.2.1.1. Tratamento sub-crônico

No tratamento sub-crônico, os animais receberam (via gavagem) durante as quatro primeiras semanas, água mineral. Nas quatro semanas seguintes, receberam extratos de *L. albus* e nas quatro últimas semanas água mineral. Após as 12 semanas e 72 horas, os animais foram eutanasiados. As coletas de todo material de investigação foi feita como descrito no item 3.2.6.4.2.1

3.2.6.2.1.2. Tratamento crônico

Os animais deste tratamento receberam (via gavagem), os extratos de *L. albus*, durante todo período experimental. Após as 12 semanas e 72 horas, os animais foram eutanasiados. As coletas ocorreram como descritas no item 3.2.6.4.2.2.

3.2.6.3. Grupo de Avaliação do Potencial Antigenotóxico, Antimutagênico e Anticarcinogênico do *L. albus*.

3.2.6.3.1. Grupo de Pré- Tratamento

Neste tratamento, os animais receberam, (via gavagem), durante as quatro primeiras semanas, extratos de *L. albus*. Nas quatro semanas seguintes, foram administradas (via i.p) quatro doses de DMH, sendo uma dose por semana e diariamente água mineral. Nas últimas quatro semanas, os animais receberam água mineral. A alimentação, eutanásia e coletas ocorreram conforme descrito no item 3.2.6.4.3.1.

3.2.6.3.2. Grupo de Tratamento Simultâneo

O tratamento simultâneo foi realizado com os animais recebendo (via gavagem) água mineral durante as quatro primeiras semanas. Nas quatro semanas seguintes, foram administrados diariamente, os extratos de *L. albus*, juntamente com a administração de quatro doses de DMH (via i.p) (uma dose por semana). Nas últimas quatro semanas, os animais receberam água mineral. Após este período, houve a eutanásia e a coletas como descrito no item 3.2.6.4.4.2.

3.2.6.3.3. Grupo de Pós-tratamento

Neste tratamento, os animais receberam (via gavagem) água mineral, durante as quatro primeiras semanas. Nas quatro semanas seguintes, foram administradas (via i.p) quatro doses de DMH (uma dose por semana) e água mineral diariamente. Nas últimas quatro semanas, os animais receberam, diariamente, os extratos de *L. albus*. Após este período, houve a eutanásia e as coletas, conforme descrito no item 3.2.6.4.3.3.

3.2.6.3.4. Grupo de Tratamento Contínuo

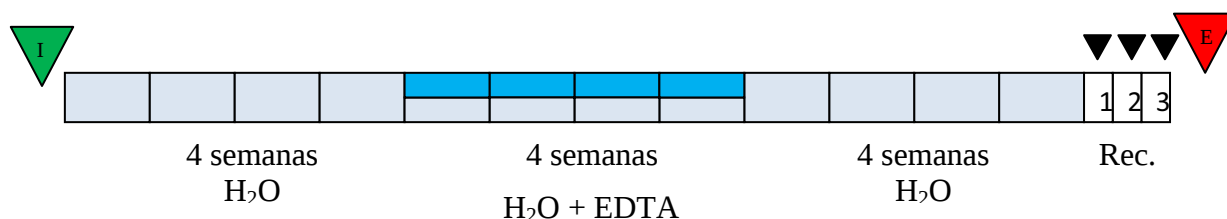
Neste tratamento, os animais receberam diariamente (via gavagem), durante as quatro primeiras semanas, os extratos de *L. albus*. Nas quatro semanas seguintes, foram também administrados diariamente os extratos de *L. albus*, juntamente com as quatro doses de DMH i.p, sendo uma dose por semana. Após este período, os animais permaneceram por mais

quatro semanas na gaiola, recebendo diariamente, os extratos de *L. albus*. A eutanásia e as coletas ocorreram como descritas no item 3.2.6.4.3.4.

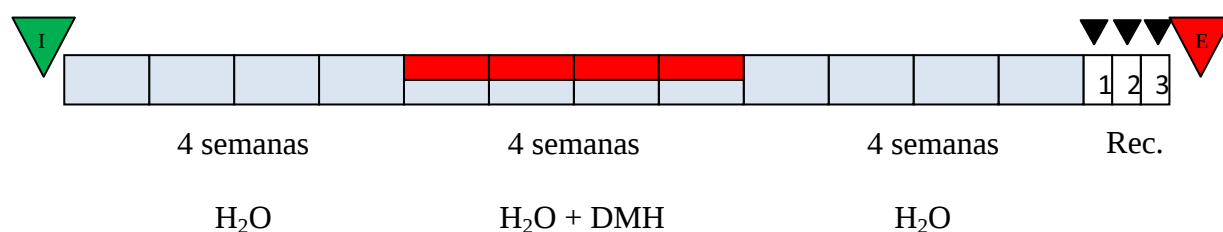
3.2.6.4. Esquema do delineamento experimental

3.2.6.4.1. Grupos Controle

3.2.6.4.1.1. Grupo de Tratamento Controle Negativo

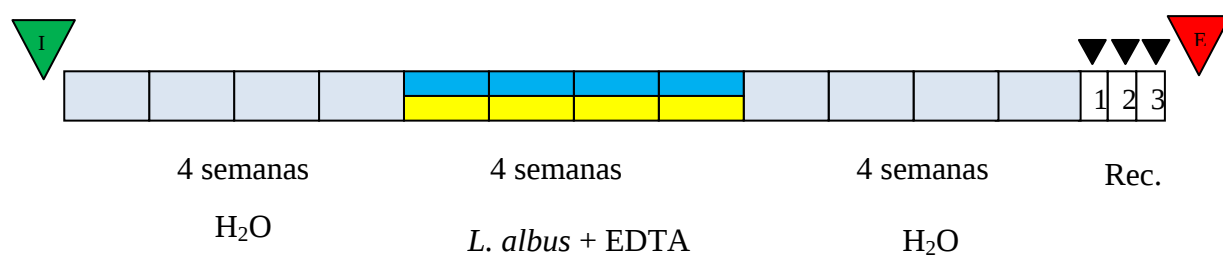


3.2.6.4.1.2. Grupo Tratamento Controle Positivo

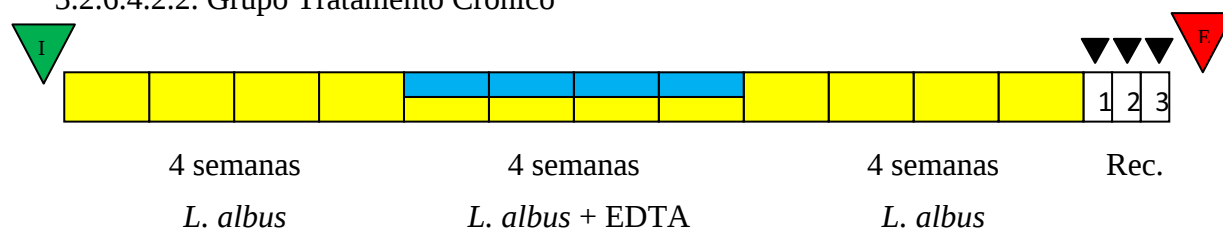


3.2.6.4.2. Grupo de avaliação do potencial genotóxico, citotóxico e mutagênico de *L. albus* em medula óssea de camundongos *Mus musculus*.

3.2.6.4.2.1. Grupo Tratamento Sub-crônico

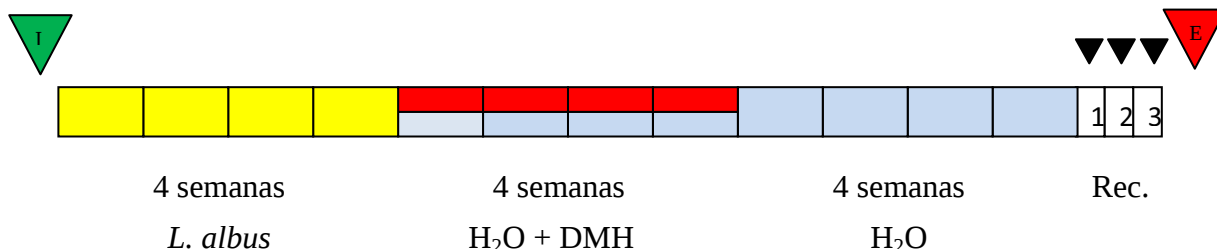


3.2.6.4.2.2. Grupo Tratamento Crônico

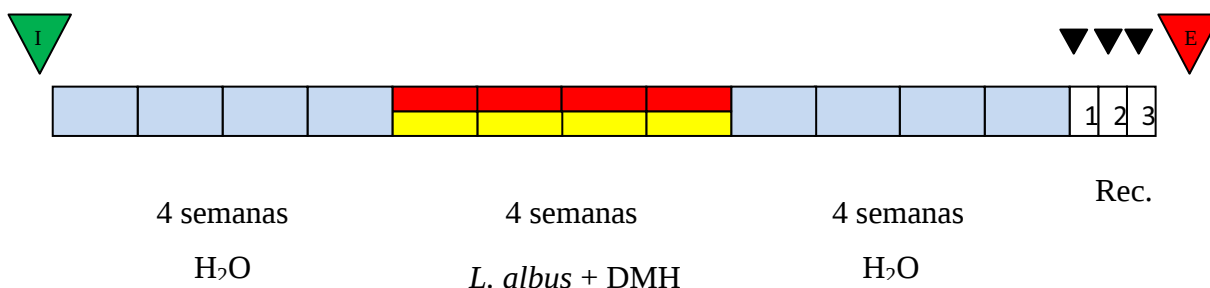


3.2.6.4.3. Grupo de avaliação dos efeitos de *L. albus* na antigenotoxicidade, antimutagenese, carcinogênese e anticarcinogênese de cólon de camundongos *Mus musculus*.

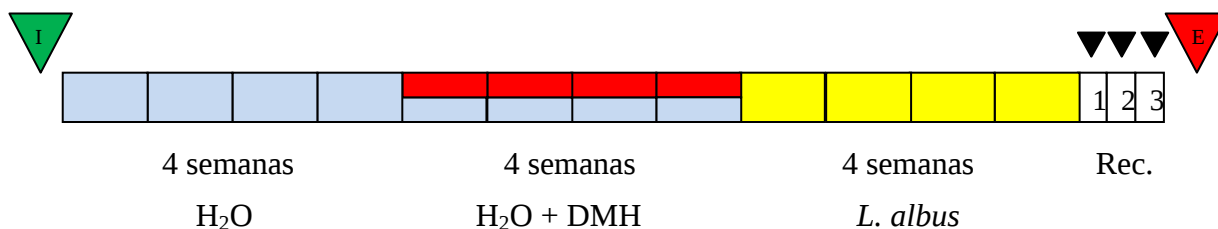
3.2.6.4.3.1. Grupo de Pré-Tratamento



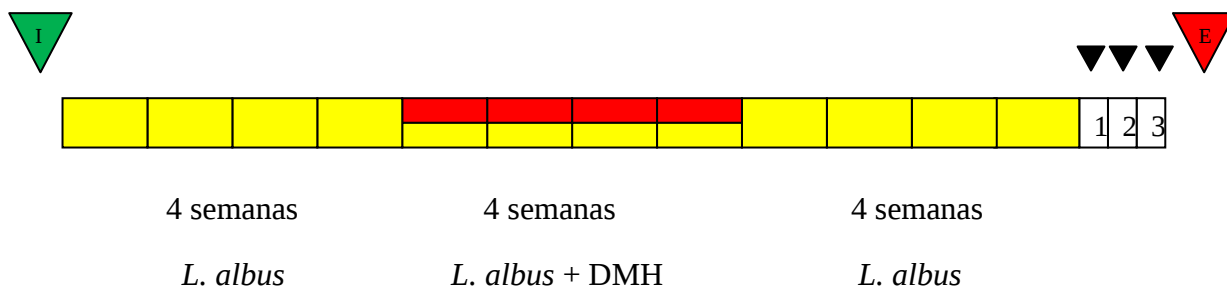
3.2.6.4.3.2. Grupo de Tratamento Simultâneo



3.2.6.4.3.3. Grupo de Pós- Tratamento



3.2.6.4.3.4. Grupo de Tratamento Contínuo



Início do experimento

Eutanásia

▼ Coletas de sangue periférico para contagem diferencial nos períodos de recuperação e para as análises bioquímicas antes da eutanásia



Tratamento com água



Tratamento com *L. albus*



Tratamento com água e EDTA



Tratamento com água e DMH



Tratamento com *L. albus* e EDTA



Tratamento com *L. albus* e DMH

1

Período de recuperação, 24 horas

2

Período de recuperação, 48 horas

3

Período de recuperação, 72 horas

3.2.7. Bioensaios e Análises bioquímicas

3.2.7.1. Dosagens de glicemia e colesterol

As dosagens bioquímicas de glicemia, e de colesterol total, LDL e HDL e de triglicérides foram realizadas com os kits comerciais Laborclin[®], utilizados de acordo com as indicações do fabricante. A leitura das análises foi feita por espectrofotometria, utilizando o leitor de placas ASYS- Expert Plus- Analítica.

3.2.7.2. Contagem diferencial de leucócitos

A coleta do sangue foi feita por punção caudal, retirando-se uma gota de sangue periférico, com o auxílio de uma agulha de calibre de 30x7mm. Foram confeccionados esfregaços sanguíneos e estes foram corados por 4 minutos no corante Leishman, seguido de adição de água destilada. As lâminas foram agitadas e deixadas para corar por mais 10

minutos. Após esse processo, as lâminas foram deixadas em temperatura ambiente, até sua completa secagem para serem montadas com lamínula, com Entelan[®]. As lâminas foram observadas em microscópio de luz (objetiva de 100x), para análise de 100 leucócitos por animal. A metodologia aplicada na realização da contagem diferencial destas células permitiu determinar o percentual e o número absoluto de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

3.2.7.3. Ensaio de micronúcleo em medula óssea e citotoxicidade

Após a eutanásia dos animais, foram retirados, com o auxílio de uma tesoura, os fêmures dos mesmos. Para extração da medula óssea, foram realizadas secções nas epífises dos ossos, para que o canal medular ficasse exposto. Com auxílio de uma seringa, a agulha foi introduzida no canal medular, onde foi injetado 3 mL de soro bovino fetal, que passou pelo canal medular por várias vezes, até a total retirada da medula. O material foi acondicionado em tubos falcon[®] e centrifugados por 5 minutos a 1000rpm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão obtida foi homogeneizada, para então serem confeccionadas as extensões medulares. As lâminas com as extensões medulares foram fixadas em álcool 70% por 5 minutos, secas e coradas. A coloração seguiu as etapas: passagem pela solução de Wright por 3 minutos; por soluções de Wright e tampão fosfato pH 7,4 (1:1) por 1 minuto; e em uma mistura de tampão fosfato, água destilada e corante Giemsa (10:10:1) por 10 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente, para a retirada do excesso de corante, e depois de secas por um período de mínimo de 7 dias, montadas em Entelan[®]. Esta coloração é indicada para a análise diferencial dos eritrócitos policromáticos (PCEs) e eritrócitos normocromáticos (NCEs) (RIBEIRO et al., 2003). Foram confeccionadas, para cada animal experimentado, 2 lâminas, que foram observadas (teste-cego) em microscópio de luz (objetiva de 100x). Foram contados 2000 PCEs por animal, anotando-se a frequência de NCEs e MNs, tanto em MNPCEs quanto em MNNCEs. Para a análise de citotoxicidade foi observado a frequência de NCEs nas 2000 PCEs analisadas.

3.2.7.4. Ensaio de Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Para os ensaios de FCA, foi retirado o intestino grosso dos animais, e realizada, com o auxílio de um fio de algodão, a ligadura entre o ceco e o reto. O intestino foi lavado com solução fisiológica 9% (injetado com seringa, para retirada das fezes), seccionados longitudinalmente com o auxílio de uma tesoura, e suas extremidades presas com alfinetes

emborrachados em placas de isopor[®]. Essa placa foi colocada em solução de formalina tamponada a 10%, para fixação por, no mínimo, 24 horas.

No momento da análise, o intestino foi corado com Giemsa 10% por 10 minutos e montado em uma lâmina de vidro, com a mucosa voltada para cima. A análise foi feita em microscopia de luz, (objetiva de 10x), para avaliação, identificação e quantificação dos FCA, de acordo com a técnica de Bird (1987).

3.2.8. ANÁLISES DOS RESULTADOS

3.2.8.1. Citotoxicidade

O cálculo de citotoxicidade do *L. albus* foi feita pela porcentagem de PCEs, encontrada no ensaio de MN em medula óssea, segundo a fórmula:

$$\% \text{ de PCEs} = [\text{PCEs} / (\text{PCEs} + \text{NCEs})] \times 100$$

3.2.8.2. Análise do MN

3.2.8.2.1. Mutagenicidade

3.2.8.2.1.1. Frequência de MNPCEs

Para o cálculo da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MNPCEs), foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Freq. de MNPCEs} = (\text{N}^\circ \text{ de MN} / \text{N}^\circ \text{ de PCEs}) \times 100$$

3.2.8.2.1.2. Frequência de MNNCEs

Para o cálculo da frequência de micronúcleos em eritrócitos normocromáticos (MNNCEs), foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Freq. de MNNCEs} = (\text{N}^\circ \text{ de MN} / \text{N}^\circ \text{ de NCEs}) \times 100$$

3.2.8.3. Antimutagenicidade

3.2.8.3.1. Redução de danos MN

A porcentagem de redução dos danos em eritrócitos, ocasionadas pelo efeito dos extratos de *L. albus*, foi avaliada pelo teste de MN e foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ RD} = [(\text{N}^\circ \text{ MN C+}) - (\text{N}^\circ \text{ MN grupo trat.})] / [(\text{N}^\circ \text{ MN C+}) - (\text{N}^\circ \text{ MN C-})] \times 100$$

3.2.8.3.2. Redução de danos FCA

A porcentagem de redução de danos de FCA no cólon dos camundongos, ocasionadas pelos extratos de *L. albus*, foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ RD} = [(\text{N}^\circ \text{ FCA C+}) - (\text{N}^\circ \text{ FCA grupo trat.})] / [(\text{N}^\circ \text{ FCA C+}) - (\text{N}^\circ \text{ FCA C-})] \times 100$$

3.2.8.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software BioEstat 5.0[®]. As variações entre os grupos e as concentrações foram realizadas por análise de variância ANOVA. Quando houve diferença estatística, foi utilizado o teste de comparação múltipla Tukey, considerando valor de $p < 0.05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

4. RESULTADOS

ARTIGO 1- Avaliação do potencial antiglicêmico e antiolesterolêmico e quantificação de alcaloides e ácidos graxos do extrato aquoso de *Lupinus albus*.

Jaqueline Aparecida de Oliveira, Eliete Luciano, Clarice Sibuya, Marcela Paula Silva, Sebastião Zanao Filho, Osmar Malaspina, Maria Aparecida Marin-Morales.

ARTIGO 2- Avaliação dos efeitos do extrato aquoso de sementes de *L. albus* sobre a carcinogênese colorretal, níveis de glicemia e colesterol e resposta imunológica de camundongos *Mus musculus*.

Jaqueline Aparecida de Oliveira, Eliete Luciano, Clarice Sibuya, Maria Aparecida Marin-Morales.

ARTIGO 3- Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos, antigenotóxicos e antimutagênicos do *Lupinus albus* por meio de ensaio do micronúcleo (MN) em medula óssea de camundongos *Mus musculus*.

Jaqueline Aparecida de Oliveira, Maria Aparecida Marin-Morales.

Avaliação do potencial antiglicêmico e anticolesterolêmico e quantificação de alcaloides e ácidos graxos do extrato aquoso de *Lupinus albus*.

Jaqueline Aparecida de Oliveira¹, Eliete Luciano ², Clarice Sibuya ², Marcela Paula Silva³, Sebastião Zanao Filho³, Osmar Malaspina³, Maria Aparecida Marin-Morales^{1*}.

¹ Departamento de Biologia, Laboratório de Mutagênese, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CEP.13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

² Departamento de Educação Física, Laboratório de Biodinâmica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CEP.13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

³ Centro de Estudos de Insetos Sociais, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CEP.13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

*Autor correspondente.

RESUMO

Lupinus albus, conhecido popularmente como tremoço branco vêm sendo avaliado sobre a possibilidade de seus isolados proteicos e de alcaloides apresentarem potencial para controlar os níveis de glicemia e colesterol. Porém, não se tem estudos quanto seu extrato bruto, como é utilizado pela população contendo tanto substâncias nutricionais quanto antinutricionais. É sabido que este material botânico contém alcaloides da família dos quinolizínicos que, se consumido em excesso, podem ser altamente tóxicos à saúde humana. Como sementes cruas deste material botânico vêm sendo usadas na medicina popular, com a intenção de reduzir os níveis de glicemia e colesterol, o objetivo deste trabalho foi avaliar os níveis de glicemia e colesterol no soro de camundongos *Mus musculus* tratados com extrato aquoso de *L. albus*, bem como determinar e quantificar os alcaloides e ácidos graxos presentes no extrato e investigar a presença de flavonoides e saponinas. Em nossos estudos foi possível observar, através de testes bioquímicos, que os extratos de *L. albus*, ao contrário do que acontece em isolados proteicos, causaram uma hiperglicemia nos animais tratados, tanto no uso sub-crônico quanto no uso crônico. As avaliações realizadas sobre os níveis de colesterol mostraram não haver alteração desses níveis, portanto, não acarretando em qualquer melhora pelo seu uso. Para as análises fitoquímicas foi possível determinar e quantificar o alcaloide lupanina, os ácidos graxos palmítico, linoleico, oleico e esteárico no extrato deste material botânico e identificar a presença de saponinas.

Palavras-chave: Tremoço branco; Lupanina; Hiperglicemia; Fitoquímicos bioativos, colesterolemia.

ABSTRACT

Lupinus albus, popularly known as white lupine have been reported on the possibility of their protein isolates and alkaloids have a potential to control blood glucose levels and cholesterol. However, no studies have as their crude extract, as used by the population containing both nutritional and anti-nutritional substances. It is known that this plant material contains quinolizidine family of alkaloids that, if consumed in excess, can be highly toxic to human health. As raw seeds of this plant material have been used in folk medicine, with the intention of reducing the levels of blood glucose and cholesterol, the aim of this study was to evaluate the levels of glucose and cholesterol in serum of mice *Mus musculus* treated with aqueous extract of *L. albus*, as well as determine and quantify the alkaloids and fatty acids present in the extract and investigate the presence of flavonoids and saponins. In our studies we observed through biochemical tests, that of *L. albus*, unlike what happens in protein isolates, caused hyperglycemia in treated animals, both in use and in the sub-chronic chronic. The assessments of cholesterol levels showed no change in these levels, therefore not resulting in any improvement for its use. For phytochemical analysis was able to determine and quantify the alkaloid lupanine, fatty acids palmitic, linoleic, oleic and stearic acids in the extract of this plant material and identify the presence of saponins.

Keywords: White lupine; Lupanine; Hyperglycemia; Bioactive phytochemicals, Cholesterolemia.

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial da Saúde estima que 80% da população mundial depende da medicina tradicional para suas necessidades básicas de saúde, e que quase 85% da medicina tradicional envolvem o uso de plantas medicinais, na forma de extratos vegetais ou pelo uso de princípios ativos presentes nesses organismos (IUCN, 1993).

No Brasil, há um grande número de plantas medicinais usadas popularmente para o tratamento da Diabetes Mellitus (DM), muitas vezes associadas à medicação convencional (alopática), o que pode levar a sérios riscos à saúde de seus usuários. Do ponto de vista científico, muitas dessas plantas possuem substâncias potencialmente ativas e, por esta razão, devem ser utilizadas com cautela, respeitando seus riscos toxicológicos. As plantas sintetizam diferentes compostos, secundários ao seu metabolismo que são utilizados na atração de polinizadores e dispersores, ataque e defesa contra predadores (VIEGAS et al., 2005). As substâncias derivadas desses metabólitos secundários podem ser alcaloides, compostos fenólicos, flavonoides, taninos, entre outros.

O gênero *Lupinus*, popularmente conhecido como tremoço, pertence à família Fabaceae. São plantas anuais, de hábito herbáceo, adaptada a climas temperados e subtropicais. As plantas deste gênero possuem muitas vantagens nutricionais, porém, alguns cultivares apresentam conteúdos elevados de alguns fatores antinutricionais, tais como alcaloides e taninos, além de pequena quantidade de inibidores de tripsina (RIBEIRO, 2006; PUTNAM et al., 1989). No tremoço são encontrados os alcaloides lupanina, esparteína, lupinina, isolupanina, angustifolina e L-17-hidroxilupanina, todos pertencentes ao grupo dos alcaloides quinolizidínicos (QAs), sendo os dois primeiros deles considerados os mais tóxicos e o último, aproximadamente, dez vezes menos tóxico que os primeiros (SILVA et al., 1991; SALDAÑA et al., 1998).

A lupanina é um alcaloide pouco explorado farmacologicamente, cuja ação tóxica é menor que a da esparteína. Em dose elevada, a lupanina pode provocar parada cardíaca em diástole e em dose baixa pode reduzir o fluxo coronariano, a amplitude de contração e a frequência cardíaca (DUKE 1987; BRUNETON, 1993; POTHIER et al., 1998), além de apresentar efeitos espasmódicos e relaxamento uterino (SCHMITT, 1980; POTHIER et al., 1998).

A esparteína tem numerosas propriedades farmacológicas, tais como efeitos anti-hipertensivos (FAUCON; OLLAGNIER 1978; SCHMITT, 1980; COHEN 1981; CARRAZ; CARRAZ, 1985), relaxante uterino (LECHAT 1978; COHEN, 1981), diuréticos (SCHMITT, 1980; COHEN 1981), anestésicos (SCHMITT, 1980; COHEN 1981), além de efeitos sobre o

sistema nervoso autônomo, incluindo o bloqueio ganglionar, efeitos anti-muscarínicos e efeitos sobre o sistema nervoso central (LECHAT 1978; SCHMITT, 1980; COHEN, 1981).

Lupinus albus (*L. albus*), conhecido popularmente como tremço branco, possui 36-52% de proteínas, 5-20% de óleo, com uma elevada concentração de ácidos graxos poli-insaturados (MUSQUIZ et al., 1989), principalmente do grupo oleico e linoleico, compreendendo 86% do óleo total encontrado (WILLIAMS; MCGIBBON, 1980). Possui ainda 30-40% de fibras em suas sementes (GROSS et al., 1988; PETTERSON; MACKINTOSH, 1994), que são responsáveis pelo armazenamento de açúcares, além de possuir muitas propriedades desejáveis como capacidade de retenção elevada de água (cerca de 7,1 ml de água por grama de tremço), baixo teor de sódio e cálcio, em comparação a outras leguminosas (RAHMAN; GLADSTONES, 1987), altos níveis de carotenóides e zeaxantina, responsáveis pela cor amarela brilhante dos cotilédones (ENTISAR; HUDSON, 1979). Cerca de 18% do peso da casca de suas sementes são compostas de polissacarídeos estruturais, tais como celulose, hemicelulose e lignina, além de um baixo teor de amido (2,3%), enquanto que outras leguminosas podem conter até 50% destes polissacarídeos (BEROAD; FILIATRE, 1976).

Há vários estudos realizados com isolados proteicos de *L. albus*, dentre eles os realizados por Magni et al., (2004), que mostraram que a proteína isolada γ -conglutina, quando testada em ratos, apresenta capacidade de reduzir os níveis de glicemia. Sirtori et al., (2004) mostraram um efeito benéfico sobre os níveis de LDL-colesterol, onde a administração do isolado proteico foi capaz de melhorar os níveis desta lipoproteína no soro de ratos, fator este muito importante pelo fato desta lipoproteína ser uma das principais envolvidas na aterosclerose. Como as sementes de *L. albus* vêm sendo utilizadas *in natura* na medicina popular, como um adjuvante no tratamento de DM e colesterol, como existe apenas estudo realizados com os isolados proteicos deste material, que são isentos dos componentes antinutricionais da planta, e como não existe estudos mostrando os efeitos do conteúdo total das sementes de *L. albus* para o organismo humano, este trabalho teve por objetivo avaliar os efeitos dos extratos aquosos das sementes de *L. albus* sobre os níveis de glicemia e colesterol de soro dos camundongos tratados, bem como, determinar e quantificar os alcaloides e ácidos graxos presentes nos extratos administrados.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.2. Material vegetal

2.1.2.1. Obtenção do Material Vegetal

Sementes de *Lupinus albus* (*L. albus*), adquiridas no comércio de grãos destinados a alimentação humana, foram trituradas para serem usadas na formulação dos extratos aquosos das sementes.

2.1.3 Agentes Químicos

O agente químico utilizado nos testes realizados com o grupo controle positivo foi a 1,2-dimetilhidrazina (DMH; Sigma[®], CAS: n° 306-37-6), concentração de 20 mg/kg, diluída em solução de EDTA (0,37 mg/ml). A solução foi administrada aos animais pela via intraperitoneal (i.p), na proporção de 0,1 ml/10g de peso corpóreo (p.c).

2.1.4. Animais Experimentais

Foram utilizados, em todos os ensaios realizados, camundongos machos (n=5) da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso inicial aproximado de 30 gramas, provenientes da empresa ANILAB[®]. Os animais permaneceram por todo período experimental no biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)- Campus de Rio Claro, Instituto de Biociências. A temperatura do ambiente foi mantida a 22±2°C, umidade relativa do ar a 55±5%, e ciclo claro e escuro de 12 horas. Os animais receberam água mineral e ração Nuvital[®] *ad libitum*, por todo período experimental. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação do Comitê de Ética em Uso Animal (CEUA) do IB/UNESP-Rio Claro.

2.1.4.1. Eutanásia dos animais

Os animais utilizados nos experimentos foram eutanasiados por deslocamento cervical, sem a utilização de meios analgésicos, devido ao fato da eutanásia química poder interferir na fidelidade dos resultados.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparo do extrato aquoso de *L. albus*

As sementes de *L. albus* foram trituradas em liquidificador, até ficarem com aspecto de farinha. Esta farinha foi então misturada com água e a solução obtida foi submetida à homogeneização em “mixer”, por 1 minuto, para o preparo do extrato aquoso, nas concentrações de 0,5 mg/kg e 1,5 mg/kg. A obtenção da farinha foi realizada semanalmente,

mas os extratos foram preparados diariamente, sempre no momento da administração para os camundongos, para evitar a contaminação microbiana ou a sua degradação, segundo indicação de Simões et al. (2004). As diferentes concentrações preparadas foram administradas, pelo método de gavagem, na proporção de 0,1 ml/10g de peso corpóreo (p.c).

Esse extrato foi utilizado nos bioensaios e nas análises fitoquímicas, referentes a determinação e quantificação de alcaloides, ácidos graxos e para a identificação de flavonoides e saponinas.

2.2.2. Extração dos alcaloides para cromatografia gasosa

A parte lipídica do extrato foi retirada em hexano, por duas vezes. Após o desengraxamento, foi feita a alcalinização com hidróxido de amônia, para seguir a extração dos alcaloides em clorofórmio (pH > 10), processo também repetido por duas vezes. Após a extração, foi feita a lavagem com água, até que o pH atingisse a neutralidade. A seguir, o clorofórmio foi passado em uma coluna preparada com sulfato de sódio anidro e lã de vidro, para a retirada de qualquer vestígio de água decorrente da extração clorofórmica, para então ser injetados no GCMS- tempo real.

2.2.3. Extração dos ácidos graxos para cromatografia gasosa

Os ácidos graxos dos extratos foram extraídos em hexano, seguido de evaporação em chapa aquecida a 50°C. Após a evaporação total do hexano, foram adicionados 2 ml de metanol e 280 μ l de ácido sulfúrico diluído em 10 ml de metanol. Para a hidrólise, foram adicionados 500 μ l de hidróxido de potássio e a solução resultante foi levada a um banho-maria a 60° C por 30 minutos. Para a esterificação, foi acrescentado 1 ml de ácido sulfúrico e mantido em banho-maria por mais 30 minutos, seguido de agitação com adição de 5 ml de hexano. Após agitação, a solução foi submetida à decantação para a separação das fases. O sobrenadante foi utilizado nas análises realizadas com CGMS- tempo real, pois os ácidos graxos ficam retidos nesta solução.

2.2.4. Identificação da presença de flavonoides

Em 1 ml do extrato, para as duas concentrações, foi adicionado 4 ml de álcool etílico e 100 μ l de cloreto de alumínio diluído em metanol 2%.

2.2.5. Identificação das saponinas

Para identificação da presença de saponinas, foi preparado o extrato e observado a presença de espuma persistente.

2.2.6. Delineamento Experimental

Os experimentos foram realizados com duas diferentes concentrações do extrato aquoso de *L. albus* (0,5 mg/kg/dia e 1,5 mg/kg/dia), que equivalem para camundongo, a 3 sementes/dia e a 9 sementes/dia para uso humano. Os ensaios foram realizados separadamente, para cada uma das concentrações. Os animais foram subdivididos em 4 diferentes grupos experimentais: o grupo controle negativo, controle positivo e os grupos tratados com extratos aquosos de *L. albus*, subdivididos em grupo de tratamento sub-crônico e tratamento crônico. Os experimentos foram realizados pela exposição de 5 animais para cada um dos diferentes ensaios e concentrações. Os animais foram submetidos ao tratamento por 12 semanas e por 72 horas de recuperação, conforme protocolo sugerido por Mauro (2008), conforme descrito no item 2.2.6.1.

2.2.6.1. Grupos Controles

2.2.6.1.1. Grupo de Tratamento Controle Negativo

Neste grupo, os animais receberam, pelo método de gavagem, durante as primeiras quatro semanas de experimentação, 0,1 ml/10g de peso corpóreo (p.c) de água mineral. Após essas quatro semanas, os animais receberam quatro doses de solução de EDTA (0,37 mg/ml), via intraperitoneal (i.p), sendo 0,1 ml/10g p.c por semana (para provocar o mesmo estresse dos animais que receberam que o DMH utilizado no grupo controle positivo), sendo uma dose por semana, e nas últimas quatro semanas receberam, diariamente por gavagem água mineral. Por todo o período experimental, os animais foram tratados com água mineral e ração Nuvital® *ad libitum*.

Completado as 12 semanas e 72 horas, foi coletado sangue periférico, através da punção caudal, para a realização da análise bioquímica de glicemia, de colesterol total, LDL, HDL e de triglicérides. Após a realização da eutanásia dos animais, por deslocamento cervical, todos os órgãos também foram coletados, pesados e avaliados macroscopicamente.

2.2.6.1.2. Grupo de Tratamento Controle Positivo

Neste tratamento, os animais receberam, durante as quatro primeiras semanas, água mineral, por gavagem. Nas quatro semanas seguintes receberam quatro doses de DMH, via

i.p, sendo administrada uma dose por semana, na concentração de 20 mg/kg. Nos demais dias deste experimento foi administrado, por gavagem, água mineral, até completar 12 semanas de tratamento. A alimentação, eutanásia e a coleta ocorreram conforme descrito no item 2.2.6.1.1.

2.2.6.2. Grupo de Tratamento com *L. albus*.

2.2.6.2.1. Tratamento sub-crônico

Neste tratamento, os animais receberam, sempre por gavagem nas quatro primeiras semanas, água mineral, nas quatro semanas seguintes extrato de *L. albus* e nas quatro últimas semanas água mineral. Após 12 semanas e 72 horas, as coletas ocorreram como descritas anteriormente e os animais foram eutanasiados.

2.2.6.2.1.2. Tratamento crônico

Os animais receberam diariamente por gavagem o extrato de *L. albus*, durante todo período experimental. Após 12 semanas e 72 horas, as coletas ocorreram como descritas anteriormente e os animais foram eutanasiados.

2.2.7. Bioensaios e Análises bioquímicas

2.2.7.1. Dosagens de glicemia e colesterol

As dosagens bioquímicas de glicemia, de colesterol total, LDL, HDL e de triglicérides foram feitas com os kits comerciais Laborclin[®], de acordo com as indicações do fabricante. A leitura foi feita por espectrofotometria em leitor de placas ASYS- Expert Plus-Analítica

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Biometria

A tabela 1 apresenta relação do peso médio absoluto dos animais, expresso em gramas $\pm$ desvio padrão, no período inicial e final do experimento e o ganho de peso durante o período experimental.

Quando os pesos iniciais e finais foram comparados entre si, em cada grupo experimental, foi possível observar que os pesos finais dos grupos CN ($35.02 \pm 2.71g$); tratamento sub-crônico, concentração de 0.5 mg/kg/dia ($32.30 \pm 2.48g$) e concentração de 1.5 mg/kg/dia ($35.10 \pm 2.96g$), e tratamento crônico, concentração de 0.5 mg/kg/dia ($38.10 \pm 1.67g$) e 1.5 mg/kg/dia ($34.60 \pm 1.34g$), tiveram resultados estatisticamente significativos. Já quando

foram comparados os ganhos de peso dos animais tratados em relação ao CN, não foram observados resultados estatisticamente significativos. Os resultados mostraram que para todos os grupos houve um aumento de peso durante o período experimental, sendo que o grupo de tratamento sub-crônico, na concentração de 0.5 mg/kg/dia (3.04 ± 1.82 g); o grupo de tratamento crônico, na concentração de 1.5 mg/kg/dia (2.94 ± 2.58 g); tiveram o menor ganho de peso quando comparado ao grupo CN (4.34 ± 2.00 g).

Tabela 1: Peso corpóreo, inicial, final e ganho do peso, dos camundongos experimentados, grupos tratados com extratos de *L. albus* e os respectivos controles (CN e CP).

Grupos	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de peso (g)
Controle Negativo (CN)	30.68 ± 1.82	35.02 ± 2.71^a	4.34 ± 2.00
Controle Positivo (CP)	29.52 ± 2.12	33.75 ± 2.59	4.23 ± 0.79
Trat. Sub-Crônico-0.5mg/kg/dia	29.26 ± 1.25	32.30 ± 2.48^a	3.04 ± 1.82
Trat. Sub-Crônico-1.5mg/kg/dia	30.44 ± 1.82	35.10 ± 2.96^a	4.66 ± 1.43
Trat. Crônico-0.5mg/kg/dia	32.66 ± 0.99	38.10 ± 1.67^a	5.44 ± 2.29
Trat. Crônico-1.5mg/kg/dia	31.66 ± 1.43	34.60 ± 1.34^a	2.94 ± 2.58

^a Estatisticamente significativo quando comparados peso inicial e final de cada grupo (ANOVA e tukey $p < 0.05$)

3.1.2. Peso dos órgãos dos animais experimentados.

Na tabela 2 estão representados os valores médios do peso absoluto dos órgãos coletados dos animais, expressos em gramas $\pm$ desvio padrão. A análise estatística indicou diferença significativa para o peso médio absoluto do pâncreas dos animais do tratamento sub-crônico, concentrações de 0.5 mg/kg/dia (0.249 ± 0.074 g) e 1.5 mg/kg/dia (0.230 ± 0.053 g); do tratamento crônico, concentração de 1.5 mg/kg/dia (0.205 ± 0.025 g), quando comparados ao CN (0.161 ± 0.016 g). Os demais órgãos não apresentaram diferenças significativas, quando comparadas ao CN.

Na tabela 3 estão apresentados os pesos médios relativos aos órgãos dos animais (gramas $\pm$ desvio padrão), os resultados mostram diferenças estatisticamente significativas para o pâncreas, para os mesmos grupos que apresentaram diferenças no peso absoluto, sendo eles os grupos de tratamento sub-crônico, concentração de 0.5 mg/kg/dia (0.007 ± 0.0017 g); o tratamento sub-crônico, concentração de 1.5 mg/kg/dia (0.006 ± 0.0012 g); o tratamento crônico, concentração de 1.5 mg/kg/dia (0.005 ± 0.0006 g), quando comparados ao CN.

No peso relativo, outros órgãos que não tiveram resultados significativos para o peso absoluto também apresentaram resultados significativos, como, por exemplo, o baço, de animais do tratamento sub-crônico, concentração de 1.5 mg/kg/dia (0.005 ± 0.0020 g), indicando um aumento significativo, em relação ao CN (0.003 ± 0.0006 g), e os rins de animais

do tratamento sub-crônico, concentração de 0.5 mg/kg/dia(0.02 ± 0.002 g), em relação ao CN (0.01 ± 0.002 g).

Todos os órgãos que apresentaram resultados estatisticamente significativos apresentaram diferença macroscópica, quando comparados aos animais do CN. Existem estudos que relatam efeito nocivos dos inibidores de proteases em animais alimentados com leguminosa crua, confirmando muitos estudos que citam efeitos deletérios para os componentes deste vegetal, principalmente por desencadear alterações metabólicas do pâncreas, como aumento da secreção enzimática, hipertrofia, hiperplasia e redução da taxa de crescimento (AL-WESALI et al., 1995).

O aumento dos rins pode sugerir que o extrato, em tratamento sub-crônico, concentração de 0.5 mg/kg/dia, levou a um processo inflamatório, o que pode ter ocasionado alguma lesão neste órgão. Para o baço, o aumento indica que o extrato sub-crônico, concentração de 1.5 mg/kg/dia, ocasionou uma hipertrofia, que pode ser por resposta imune dada pelo processo inflamatório ou por alguma neoplasia, uma vez que quando o baço aumenta de tamanho, aumenta também a sua capacidade de reter e armazenar células sanguíneas, podendo reduzir o número de eritrócitos, de leucócitos e de plaquetas circulantes.

Tabela 2: Valores médios±desvio padrão do peso absoluto dos órgãos dos animais, após o período de experimentação

Grupos	Baço	Coração	Fígado	Pâncreas	Pulmão	Rins	Testículo	Tireoide
Controle Negativo (CN)	0.097±0.031	0.180±0.054	1.28±0.232	0.161±0.016	0.241±0.129	0.367±0.104	0.167±0.034	0.216±0.019
Controle Positivo (CP)	0.080±0.019	0.144±0.019	1.18±0.170	0.174±0.031	0.241±0.100	0.333±0.125	0.157±0.017	0.221±0.039
Trat. Sub-crônico-0.5mg/kg/dia	0.163±0.154	0.160±0.022	1.54±0.643	0.249±0.074*	0.199±0.053	0.481±0.067	0.218±0.068	0.236±0.047
Trat. Sub-crônico-1.5mg/kg/dia	0.169±0.078	0.168±0.038	1.38±0.288	0.230±0.053*	0.243±0.059	0.783±0.750	0.194±0.035	0.222±0.047
Trat. Crônico-0.5mg/kg/dia	0.093±0.016	0.186±0.036	1.35±0.130	0.166±0.033	0.190±0.040	0.471±0.035	0.189±0.025	0.231±0.022
Trat. Crônico-1.5mg/kg/dia	0.109±0.025	0.161±0.023	1.39±0.087	0.205±0.025*	0.196±0.050	0.472±0.043	0.161±0.042	0.215±0.042

Valores médios±desvio padrão da média representados em gramas, * significativo (p < 0,05).

Tabela 3: Valores médios±desvio padrão do peso relativo de órgãos dos animais após o período de experimentação

Grupos	Baço	Coração	Fígado	Pâncreas	Pulmão	Rins	Testículo	Tireoide
Controle Negativo (CN)	0.003±0.0006	0.005±0.0010	0.036±0.006	0.004±0.0007	0.007±0.0040	0.01±0.002	0.005±0.001	0.006±0.0002
Controle Positivo (CP)	0.002±0.0007	0.004±0.0006	0.040±0.006	0.005±0.0008	0.007±0.0030	0.009±0.003	0.005±0.0008	0.006±0.0010
Trat. Sub-crônico-0.5mg/kg/dia	0.005±0.0050	0.005±0.0005	0.050±0.024	0.007±0.0017*	0.006±0.0010	0.02±0.0020*	0.007±0.0010	0.007±0.0010
Trat. Sub-crônico-1.5mg/kg/dia	0.005±0.0020*	0.005±0.0010	0.040±0.005	0.006±0.0012*	0.007±0.0020	0.02±0.010	0.005±0.0005	0.006±0.0008
Trat. Crônico-0.5mg/kg/dia	0.002±0.0004	0.005±0.0010	0.040±0.003	0.004±0.0007	0.004±0.0020	0.01±0.0006	0.004±0.0006	0.006±0.0005
Trat. Crônico-1.5mg/kg/dia	0.003±0.0008	0.005±0.0007	0.040±0.003	0.005±0.0006*	0.005±0.0010	0.01±0.0010	0.004±0.0010	0.006±0.0010

Valores médios±desvio padrão da média representados em gramas, * significativo (p < 0,05).

3.3. Determinação e quantificação dos alcaloides do extrato de *L. albus*

A determinação e quantificação dos alcaloides presentes no extrato aquoso de *L. albus* foi realizado pelo método de extração de alcaloides e posteriormente avaliação em GCMS-QP 2010 Plus em tempo real. Por este método, foi encontrado apenas o alcaloide lupanina. A presença da lupanina corrobora com os resultados encontrados por Ganzera et al., (2010)

As figuras abaixo mostram os picos do padrão dos alcaloides e do extrato de *L. albus*. Através desses picos, dados pela sua absorbância, foi possível quantificar a massa da lupanina presente no extrato, calculada pela comparação entre a massa encontrada e a massa da biblioteca de dados do programa, bem como pelo pico anterior e posterior da lupanina. As análises foram feitas em triplicata.

Figura 1: Representação do padrão dos alcaloides, presentes no extrato de *L. albus*, obtidos por meio de cromatografia gasosa. A lupanina está representada no pico 5, entre o C18 (pico 4) e C20 (pico 6).

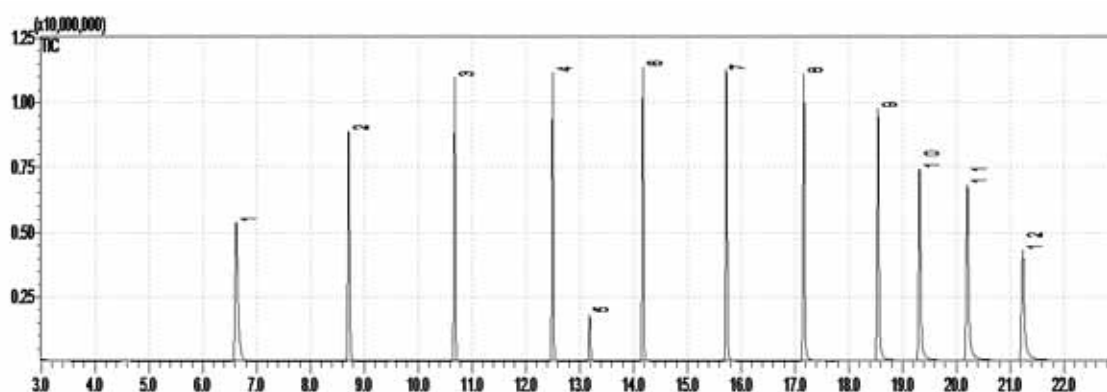


Figura 2: Cromatograma da primeira amostra, sendo o pico 2 o pico da lupanina.

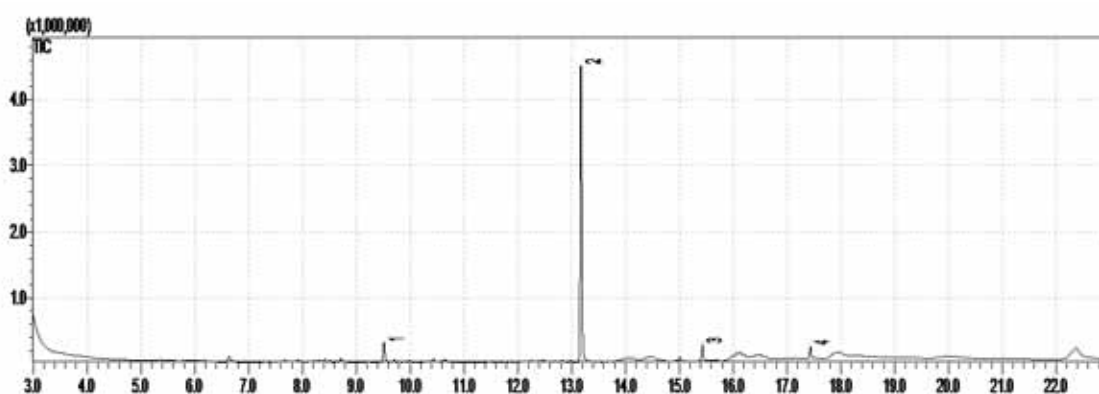


Figura 3: Cromatograma da segunda amostra, sendo o pico mais evidente o pico da lupanina.

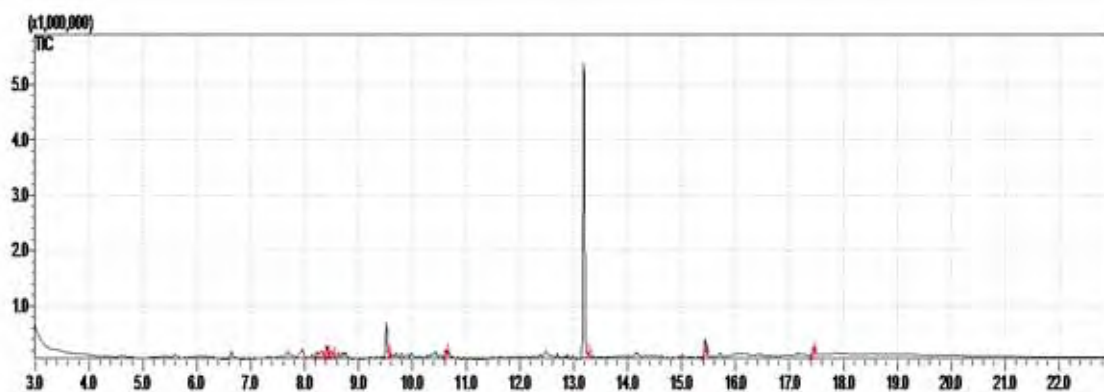
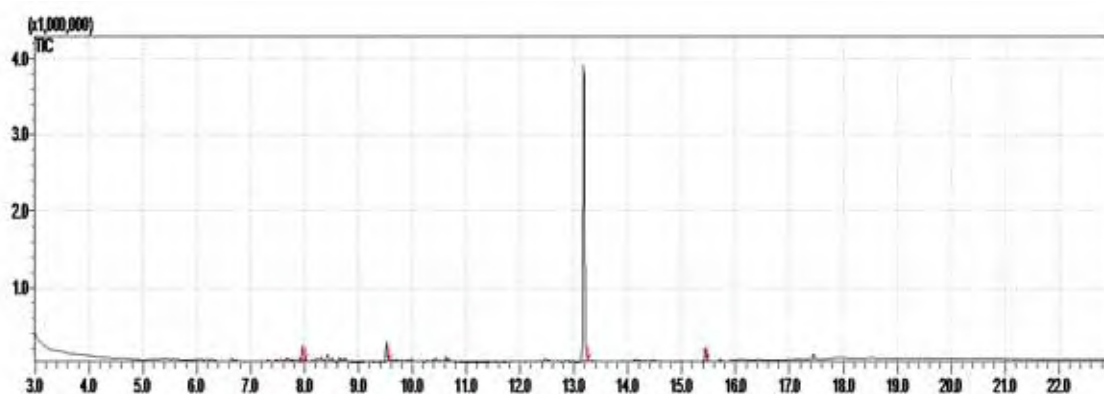


Figura 4: Cromatograma da terceira amostra, sendo o pico mais evidente o pico da lupanina.



No extrato de *L. albus*, a massa encontrada para a lupanina na concentração de 0.5 mg foi de 0.539 μg e para a concentração de 1.5 mg foi de 1.62 μg . Segundo Wink (2005), a DL^{50} de lupanina para ratos tratados por via oral é de 410 mg/kg/dia. Assim, os resultados encontrados nestas dosagens indicam que as quantidades de lupanina encontradas nos extratos estão dentro da normalidade para consumo dos camundongos.

3.4. Determinação e quantificação de ácidos graxos dos extratos de *L. albus*

Na tabela 4 estão representadas as porcentagens e as massas dos ácidos graxos encontrados no extrato de *L. albus*, para as duas concentrações experimentadas. Para a concentração de 0.5 mg foi encontrado 0.31%, equivalente à 1.5 μg de ácidos graxos totais. Para a concentração de 1.5 mg foi encontrado 0.93%, equivalente à 4.5 μg de ácidos graxos totais. Dentre o total de ácidos graxos encontrados no extrato de *L. albus*, estão os ácidos graxos saturados: palmítico (0,07%), para a concentração de 0.5 mg e 0,21% para a concentração de 1.5 mg; e esteárico (0.03%) para a concentração de 0.5 mg e 0.09% para a concentração de 1.5 mg. Dentre os ácidos graxos insaturados, estão o ácido linoleico (0.03% para a concentração de 0.5 mg) e 0.09% para o extrato na concentração de 1.5 mg) e o ácido

oleico (0.18% para a concentração de 0.5 mg e 0.54% para o extrato na concentração de 1.5 mg.

Tabela 4: Relação em porcentagem e a massa, do total de ácidos graxos encontrados nos extratos de *L. albus*

Ac. Graxos Padrão	Concentração 0.5mg	Concentração 1.5mg
Acido laurico	-	-
Mirístico	-	-
Palmitico	0.07%	0.21%
Oleico	0.18%	0.54%
Linoleico	0.03%	0.09%
Estearico	0.03%	0.09%
Erúxico	-	-
Total %:	0.31%	0.93%
Total em massa:	1.5 <i>u g</i>	4.5 <i>u g</i>

Os ácidos graxos são nomeados de acordo com suas estruturas químicas e são classificados como saturados ou insaturados, conforme o número de duplas ligações. Aqueles que apresentam uma única dupla ligação são denominados de ácidos graxos monoinsaturados e os que apresentam duas ou mais são denominados poli-insaturados (VISENTAINER; FRANCO, 2006; TEIXEIRA, et al., 2010).

Os principais ácidos graxos saturados encontrados na natureza são os ácidos butíricos, cáprico, láurico, mirístico, palmítico, esteárico, araquídico (BOBBIO; BOBBIO, 1989; SOUZA et al., 1998). Já os ácidos graxos insaturados mais encontrados são os ácidos oleico (considerado um ácido graxo mono-insaturado), linoleico (considerado uma ácido graxo poli-insaturado), linolênico, araquidônico, e erúxico (VIANNI; BRAZ-FILHO, 1996).

Existem vários estudos mostrando que o consumo de dietas ricas em gorduras monoinsaturadas, como por exemplo o ácido oleico encontrado nos extratos de *L. albus* (cerca de 0.18%) para a concentração de 0.5 mg e (cerca de 0.54%) para a concentração de 1.5 mg/kg/dia, exerce efeitos fisiológicos que levam a redução nos níveis de colesterol total, de triglicerídeos e de LDL, sem alterar a fração HDL do plasma (REBOLLO et al., 1998; TURATTI et al., 2002; TANGO et al., 2004). Rebollo et al., (1998) observaram que o consumo de dietas ricas em ácido oleico reduz níveis de fibrinogênio do plasma, que é um composto reconhecidamente responsável no desenvolvimento de lesões das artérias e que auxilia no prognóstico de doenças coronárias.

Dentre os ácidos graxos encontrados no extrato de *L. albus* está também o ácido linoleico, cerca de 0.03% para a concentração de 0.5 mg e cerca de 0.09% para a

concentração de 1.5 mg. Estudos com ácido linoleico revelam que ele é um componente importante a ser incorporado na dieta, por ser essencial para as atividades biológicas (BIRT et al., 1999). Este ácido é um ácido graxo insaturado, que produz efeitos específicos sobre os organismos vivos. Como ele não é sintetizado pelo organismo humano e é essencial á vida, ele é denominado de ácido graxo essencial, devendo então ser suprido pela alimentação (LEAF; WEBER, 1988; LEHNINGER et al., 1995; SOUZA et al., 1998). A literatura propõe que sua atividade anticarcinogênica é evidente nas três fases da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão (VOORRIPS et al., 2002). Essa atividade anticarcinogênica do ácido linoleico vem sendo reportada na neoplasia mamária, sendo evidenciado inúmeros estudos experimentais (SHULTZ et al., 1992; IP et al., 1994; CUNNINGHAM et al., 1997; VOORRIPS et al., 2002). Em experimentos *in vitro*, é demonstrado que concentrações fisiológicas deste ácido graxo inibem o crescimento de células neoplásicas de mama (SHULTZ et al., 1992; CUNNINGHAM et al., 1997). Durgam e Fernandes (1997) sugerem que o ácido linoleico tem esse efeito decorrente de sua ação inibidora no crescimento de células mamárias, denominadas receptoras de estrogênio positivas, ou seja, relacionada ao sistema de resposta estrogênica. Os ácidos graxos essenciais, linoleico e linolênico, apresentam efeitos em diversos processos fisiológicos, sendo importantes, na prevenção e tratamento de doenças cardiovasculares, arteriosclerose, trombose, hipertrigliceridemia, hipertensão, diabetes, artrite, outros problemas inflamatórios e câncer (SALEM, 1999).

Nas figuras 5 a 8 estão os picos dos cromatogramas dos ácidos graxos do extrato aquoso de *L. albus*. Na figura 5, encontram-se os picos do padrão e nas figuras 6, 7 e 8 encontram-se os picos dos ácidos graxos presentes no extrato de *L. albus*.

Figura 5: Cromatograma dos ácidos graxos do padrão, representados por: pico 1- Ácido láurico, pico-2-Ácido Mirístico, pico-3 Ácido Palmítico, pico-4 Ácido Linoleico, pico-5 Ácido Oleico, pico-6 Ácido Esteárico, pico-7 Ácido Eurico.

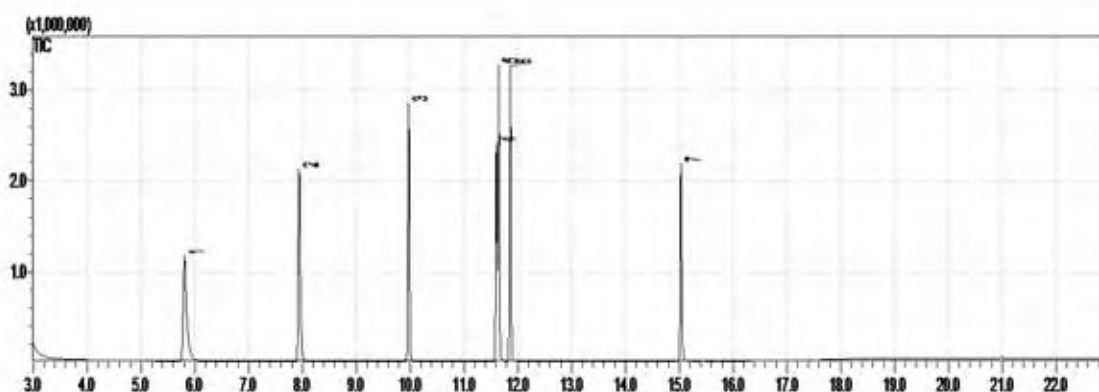


Figura 6: Cromatograma dos ácidos graxos, picos da amostra 1, representados no pico 1- ácido palmítico, pico 2- ácido oleico, pico 3- ácido linoleico, pico 4- ácido esteárico.

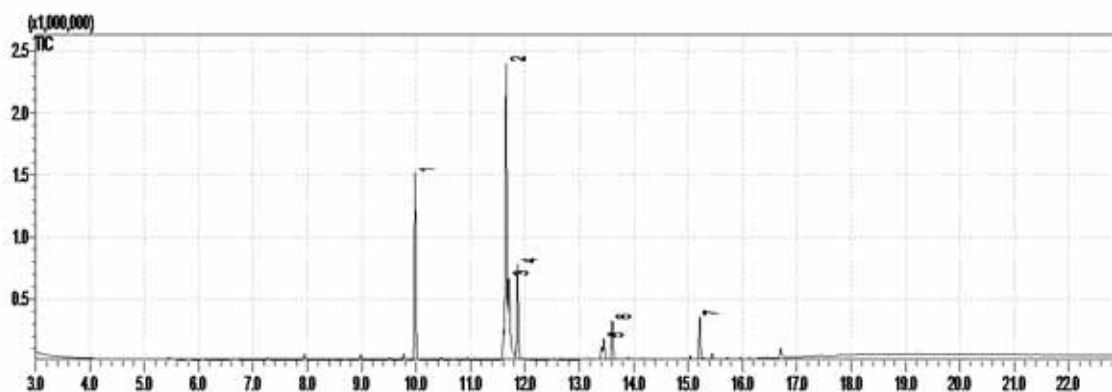


Figura 7: Cromatograma dos ácidos graxos, picos da amostra 2.

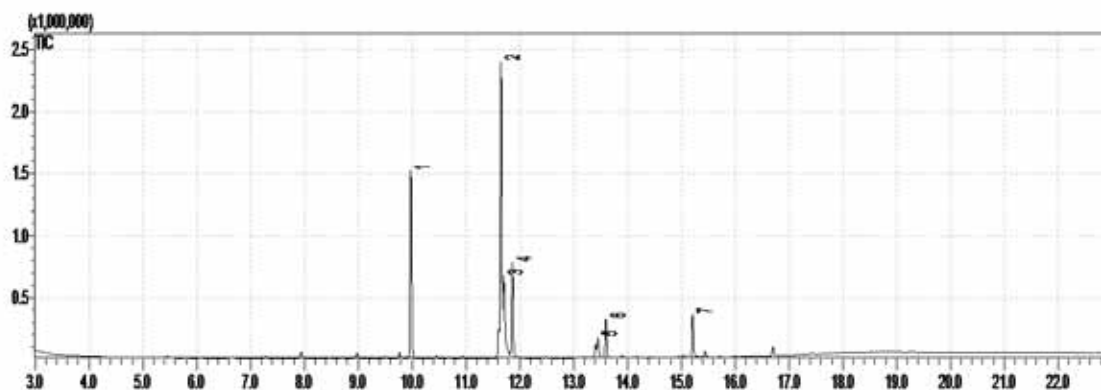
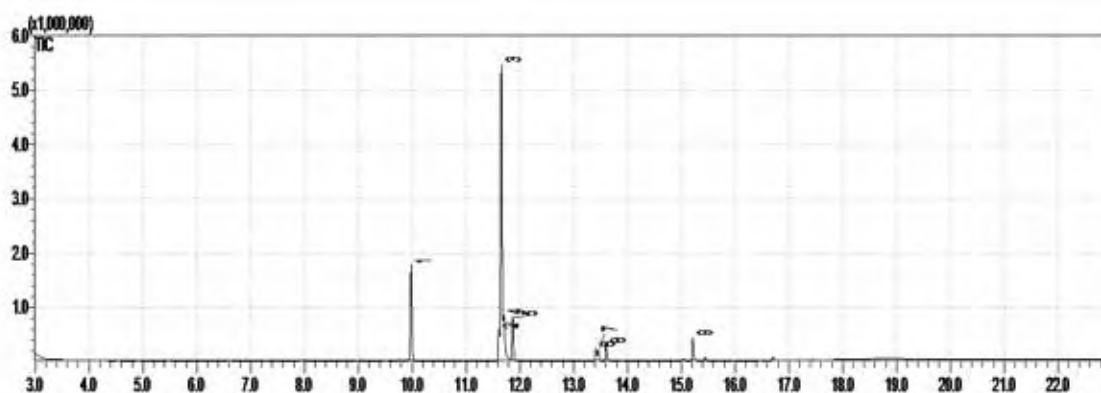


Figura 8: Cromatograma dos ácidos graxos, picos da amostra 3.



3.5. Identificação de flavonoides do extrato de *L. albus*

Com relação aos flavonoides não foram encontrados resultados positivos, ou seja, pelo método de extração utilizado, não foi possível extrair os flavonoides contidos nas sementes de *L. albus*, talvez pelo fato dos flavonoides não serem hidrossolúveis.

3.6. Caracterização de saponinas do extrato de *L. albus*

Foi possível observar no extrato de *L. albus*, para as duas concentrações, a presença de espuma persistente, o que indica a presença de saponinas nesses extratos.

3.7. Avaliação dos efeitos do extrato de *L. albus* nos níveis glicêmicos e colesterolêmicos no soro dos animais tratados

3.7.1. Índice glicêmico

Na tabela 5 estão representados os resultados da análise bioquímica referente aos índices glicêmico. O grupo controle negativo apresentou uma média de 75.5 ± 40.2 mg/dl. Os grupos experimentais que apresentaram resultados estatisticamente significativos em relação ao controle, foram os grupos de tratamento sub-crônico, concentração de 1.5 mg/kg/dia (142.4 ± 51.2 mg/dl); o grupo de tratamento crônico nas duas concentrações sendo na concentração de 0.5 mg/kg/dia (220.8 ± 57.95 mg/dl) e na concentração de 1.5 mg/kg/dia (183.4 ± 34.2 mg/dl). Estes resultados podem nos indicar que compostos bioativos de *L. albus* apresentam efeitos hiperglicêmicos, resultados estes diferentes do esperado, pois na medicina popular o *L. albus* é utilizado para reduzir os níveis de glicemia, evento este não ocorrido em nosso experimento.

3.7.2. Índice colesterolêmicos

3.7.2.1. Colesterol total

Pela análise dos níveis de colesterol total, apresentados na tabela 5, o grupo CN apresentou resultado de 195 ± 21.8 mg/dl. Quando comparados os grupos experimentais com o CN, foi observado que não houve resultados estatisticamente significativos entre eles (grupo experimental, variando de 171.9 ± 17.6 a 269 ± 86.1 mg/dl). Porém, ocorreu diminuição nos grupos de tratamento sub-crônico, concentração de 0.5 mg/kg/dia (190.5 ± 35.9 mg/dl), tratamento crônico, concentração de 0.5 mg/kg/dia (194 ± 30.6 mg/dl) e concentração de 1.5 mg/kg/dia (171.9 ± 17.6 mg/dl).

3.7.2.2. HDL-Colesterol

Para os níveis de HDL-colesterol, o grupo CN apresentou resultado de 39.7 ± 10.9 mg/dl, enquanto que nos grupos experimentais os valores variam de 36 ± 0.92 mg/dl á 41.6 ± 3.23 mg/dl, sendo que o grupo de tratamento crônico, concentração de 1.5 mg/kg/dia, foi o único grupo a apresentar um moderado aumento em comparação ao CN (41.6 ± 3.23).

3.7.2.3. LDL-Colesterol

Para os níveis de LDL-colesterol, o grupo CN apresentou resultado de 75.7 ± 55.6 mg/dl, que, quando comparados aos resultados dos grupos experimentais, não mostrou diferenças estatisticamente significativas. Porém, os grupos de tratamento crônico, para as duas concentrações, tiveram um resultado mais baixo que o grupo CN, o que pode indicar que nesse período de exposição, para ambas as concentrações, o extrato de *L. albus* foi mais eficaz em reduzir os níveis de da lipoproteína LDL, sendo observado ainda que a concentração menor de 0.5 mg/kg/dia apresentou um resultado mais baixo para esta lipoproteína (44.1 ± 19.6 mg/dl)

3.7.2.4. Triglicérides

Para os níveis de triglicerídeos, o grupo CN apresentou resultado de 90.6 ± 30.9 mg/dl que, quando comparados aos resultados dos grupos experimentais (84.2 ± 17.38 mg/dl á 184.9 ± 107.3 mg/dl) não apresentaram diferenças estatisticamente significativas entre si. Porém, o grupo de tratamento crônico, concentração de 1.5 mg/kg/dia, apresentou o único valor abaixo do encontrado para o grupo CN (84.2 ± 17.38).

De maneira geral, os grupos que se destacaram para os níveis séricos de colesterol foram tratamento crônico na concentração de 1.5 mg/kg/dia, cujo resultado foi positivo para todos os parâmetros de colesterol, estando o colesterol total abaixo do controle negativo, HDL-colesterol acima do controle negativo, LDL-colesterol e triglicérides abaixo do CN.

Tabela 5: Avaliação dos efeitos do *L. albus* sobre os níveis de glicemia, de colesterol total, HDL, LDL e triglicérides dos animais tratados.

Parâmetros	Tratamentos					
	C. Neg.	C. Pos.	Tratamento <i>L. albus</i>			
			Sub-Crônico		Crônico	
			0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia	0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia
Glicemia	75.5±40.2	117±68.0	120.9±46.4	142.4±51.2*	220.8±57.95*	183.4±34.2*
Colesterol Total	195±21.8	177.7±13.9	190.5±35.9	269±86.1	194.1±30.6	171.9±17.6
HDL- Colesterol	39.7±10.9	38.7±5.5	38.4±1.89	37.7±6.02	36±0.92	41.6±3.23
LDL- Colesterol	75.7±55.6	60±33.7	79.8±21.7	98.8±31.9	44.1±19.6	60±16.2
TRIGLICÉRIDES	90.6±30.9	146.6±81.3	184.9±107.3	165.4±90.6	138.7±67.6	84.2±17.38

* significativo (p<0.05)

Segundo Souza et al. (1998), os ácidos graxos saturados tendem a elevar os níveis de colesterol no sangue, enquanto os ácidos graxos poli-insaturados tendem a abaixar esses níveis. Segundo estes autores, os ácidos graxos saturados, especificamente o mirístico e o palmítico, são os que mais agem no aumento do colesterol. O ácido palmítico encontrado nos extratos de *L. albus*, como mostra o resultado da extração e quantificação dos ácidos graxos, corroboram os resultados encontrados nos níveis de colesterol total. Estudos realizados por Fuentes (1998) mostram que os ácidos graxos palmítico, mirístico e esteárico, também encontrados nos extratos aqui estudados, quando aplicados em animais, diminuem os níveis da lipoproteína LDL no sangue, o que realmente aconteceu no uso crônico, realizado neste trabalho. Estudos realizados por Grundy e Bonanome (1987) mostram que dietas com baixa proporção entre ácidos graxos poli-insaturados e saturados poderiam estar associadas à alta incidência de doenças cardiovasculares.

4. CONCLUSÃO

Pelos estudos realizados com o extrato de *L. albus*, foi possível identificar e quantificar o alcaloide lupanina e os ácidos graxos, palmítico, linoleico, oleico e esteárico, por meio de cromatografia gasosa, bem como caracterizar a presença de saponinas, através do teste de espuma persistente.

Os níveis de glicemia, infelizmente não corresponderam aos descritos para outros testes com isolados proteicos deste vegetal, pois, não apresentaram um efeito hipoglicêmico, e sim hiperglicêmico, quando os camundongos foram tratados com as duas diferentes concentrações de *L. albus*.

Os níveis de colesterol, registrados nesta pesquisa não indicaram um efeito hipocolesterolêmico como descrito na literatura, mas tampouco um efeito hiperlipídico.

5. REFERÊNCIAS

AL-WESALI, M., LAMBERT, N., WELHAM, T., DOMONEY, C., The influence of pea seed trypsin inhibitors on the in vitro digestibility of casein. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, Oxford, v.68, n.4, pp.431-437, 1995.

BIRT, D. F.; SHULL, J. D.; YAKTINE, A. L., **Quimioprevenção do câncer**. In: SHILS, M. E.; OLSON, J. A.; SHIKE, M.; ROSS, A. C., Tratado de nutrição moderna na saúde e na doença. 9^a ed. Rio de Janeiro: Manole, pp. 1349-1383, 1999.

BOBBIO, F. O.; BOBBIO, P. A., **Introdução à química de alimentos**. 2.ed. São Paulo Varela, 1989.

BRUNETON, J., **Pharmacognosie, Phytochimie, Plantes Medicinales**. Lavoisier-Tec et Doc, Paris, pp. 688-689, 1993.

CARRAZ, G., CARRAZ, J., **Pharmacodynamie spéciale**. Ellipses, Paris, v. 3, pp. 41, 1985.

COHEN, Y., **Abbrégé de Pharmacologie**, Masson, Paris, pp. 217-218, 1981.

CUNNINGHAM, D. C.; HARRISON, L. Y.; SHULTZ, T. D., Proliferative responses of normal human mammary and MCF-7 breast cancer cells to linoleic acid, conjugated linoleic acid and eicosanid synthesis inhibitors in culture. **Anticancer Res.** n.17, pp. 197-203, 1997.

DUKE, J. A., **Handbook of Medicinal Herbs**. CRC Press, Boca Raton, Florida, pp. 155, 1987.

DURGAM, V. R.; FERNANDES, G., The growth inhibitory effect of conjugated linoleic acid on MCF-7 cells is related to estrogen response system. **Cancer Lett.** n.116, pp. 121-130, 1997.

ENTISAR, A. E.; HUDSON, B. J. F., Identification and estimation of carotenoids in the seed of four lupin species. **J. Sci. Food Agric.** v.30, pp.1168-1170, 1979.

FAUCON, G.; OLLAGNIER, M., Vasodilatateurs. In: Giroud, J. P., Mathé, G., Meyniel, G. Pharmacologie Clinique, **Expansion Scientifique Française**, pp 503- v. 1, pp. 504, 1978.

FUENTES, J. A. G., **Que alimentos convêm ao coração?** Higiene Alimentar, São Paulo, v.12, n.53, pp.7-11, 1998.

GANZERA, M.; KRÜGER, A.; WINK, M, Determination of quinolizidine alkaloids in different Lupinus species by NACE using UV and MS detection, **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis** v.53 pp.1231–1235, 2010.

GROSS, R., von BAER, E., KOCH, F., MARQUARD, R., TRUGO, L., WINK, M. Chemical composition of a new variety of the Andean lupin (*L. mutabilis*) with low-alkaloid content. **J. Food Comp.** v. 1, pp. 353-361, 1988.

GRUNDY, S. M.; BONANOME, A., Workshop on monounsaturated fatty acids. **Arteriosclerosis**. v.7, n.6, pp.644 -648, 1987.

IP, C.; SINGH, M.; THOMPSON, H. J.; SCIMECA, J. A., Conjugated linoleic acid suppresses mammary carcinogenesis and proliferative activity of the mammary gland in the rat. **Cancer Res.** n. 54, pp.1212-1215, 1994.

IUCN, **Orientações sobre a conservação de plantas medicinais**, 1993.

LEAF, A; WEBER. P. C., Cardiovascular effects of n-3 fatty acids. **N. Eng. J. Med.**, v.318, pp.549-557, 1988.

LECHAT, P., **Pharmacologie Médicale**. Masson, Paris, pp. 570, 1978.

LEHNINGER. A. L.; NELSON, D. L.; COX. M. M., **Principio de Bioquímica**. 2. ed. São Paulo: Sarvier. 810p, 1995.

MAGNI, C.; SESSA, F; ACCARDO, E.; VANONI, M.; MORAZZONI, P.; SCARAFONI, A.; DURANTI, M. Conglutin- γ , a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. **J. Nutri. Biochem.**, v.15, p.p.646-650,2004.

MARTÍNEZ, A., **Flavonóides**. Universidade de Antioquia, Medellín, pp.20-21, 2005.

MAURO, M. O., **Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antimutagênicos e anticarcinogênicos do frutooligosacarídio inulina in vivo**. Trabalho de Conclusão de Curso. Unifil – Londrina – Paraná. 2008.

MUZQUIZ, M.; BURBANO, C.; GOROSPE, M.J.; RÓDENAS, I., A chemical study of *Lupines hispanicus* (Boiss et Reut) seed, II. 'Ibzi and antinutritional components. **J. Sci. Food Agric.**, v. 47, pp. 205-214, 1989.

PETTERSON, D. S.; MacKINTOSH, J. B., **The chemical composition of lupin seed grown in Australia**, pp. 39-48 1994.

POTHIER, J.; CHEAV, S. L.; GALAND, N.; DORMEAU, C.; VIEL, C., A Comparative Study of the Effects of Sparteine, Lupanine and Lupin Extract on the Central Nervous System of the Mouse, **J. Pharm. Pharmacol**, n.50, pp. 949-954, 1998.

PUTNAM, D. H.; OPLINGER, E. S.; HARDMAN, L. L.; DOLL, J. D. **Lupine**, 1989. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/NEWCROP/AFCM/lupine.html>, Acesso em 20/03/2013.

RAHMAN, M. S.; GLADSTONES, J. S., Differences among *Lupinus* species in field response to superphosphate. **Aust. J. Exp.Agr.** v.14, pp.214-223, 1987.

REBOLLO, A. J. G.; BOTEJA, E. M.; CANSADO, A. O.; BLANCO, P. J. M.; BELLIDO, M. M.; SÁNCHEZ, A. F.; ARIAS, P. M; ALVAREZ, J. E. C., Effects of consumption of meat product rich in monounsaturated fatty acids (the ham from the Iberian pig) on plasma lipids. **Nutrition Research**, Tarrytown, v.18, pp. 743-750, 1998.

RIBEIRO, A. G., **Desenvolvimento de protudo tipo shake utilizando farinha decorticada desengordurada de tremço doce (*Lupinus albus*) variação multolupa**. Dissertação Mestrado apresentada ao programa de pós-graduação em alimentos e nutrição da faculdade de ciências farmacêuticas UNESP-Araraquara, 2006.

SALDAÑA, M.D.A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S., **Uso de fluidos supercríticos para obtenção de alcalóides de plantas naturais**. Bol. SBCTA. Brasil, v. 32, n. 1, p. 80-88, 1998.

SALEM, Jr., N. Introduction to polyunsaturated fatty acids. **Backgrounder**, v.3, n.1, pp.1-8, 1999.

SCHMITT, H., **Elements de Pharmacologie**. Flammarion, Paris, pp. 356, 1980.

SHULTZ, T. D.; CHEW, B. P.; SEAMAN, W. R.; LUEDECKE, L. O., Inhibitory effect of conjugated dienoic derivatives of linoleic acid and beta-carotene on the in vitro growth of human cancer cells. **Câncer Lett.** n.63, pp.125-33, 1992.

SILVA, M. S. **Avaliação química, biológica e nutricional da farinha de tremço branco doce (*Lupinus albus* var. *multolupa*)**. Piracicaba, 103p. Dissertação Mestrado- ESALQ – Universidade de São Paulo, 1991.

SIMÕES, C. M. OLIVEIRA, et al. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5 Ed, Porto Alegre/ Florianópolis: UFRGS/ UFSC, 1054 p, 2004.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M.; MAGNI, C.; MORANTI, S.; D'AGOSTINA, A.; ARNOLDI, A., Proteins of white lupin seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. **J. Nutr.** n.134, pp. 18-23, 2004.

SOUZA, N. E.; MATSUSHITA, M.; VISENTAINER, J. V., Ácidos graxos: estrutura, classificação, nutrição e saúde. **Arq. Apadec.** n.2, v.2, pp. 102-107, 1998.

TANGO, J. S.; LIMONTA, C. L. CARVALHO.; SOARES, N. B., Caracterização física e química de frutos de abacate visando a seu potencial para extração de óleo. **Rev. Bras. Frutic.**, Jaboticabal - SP, v. 26, n. 1, pp. 17-23, 2004.

TEIXEIRA, H. L., **Composição química e perfil de ácidos graxos da castanha do fruto da castanhola (*Terminalia Catappa Linn*)**. Dissertação de mestrado apresentada à Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, 2010.

TURATTI, J. M.; GOMES, R.A.R.; ATHIÉ, I. **Lipídeos: aspectos funcionais e novas tendências**. Campinas: ITAL, pp.78, 2002.

VIANNE, R.; BRAZ-FILHO, R., Ácidos graxos naturais e ocorrência em alimentos, **Química nova**, v. 19, n. 4, pp.400-407 ,1996.

VIEGAS, JR.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M., Plantas medicinais: cura segura?, **Química Nova**, Vol. 28, n. 3, pp.519-528, 2005.

VISENTAINER, J. V, FRANCO, M. R. B., **Ácidos graxos em óleos e gorduras: identificação e quantificação**. São Paulo: Varela, pp.120, 2006.

VOORRIPS, L. E.; BRANTS, H. A. M.; KARDINAAL, A. F. M.; HIDDINK, G. J.; BRANDT, P. A.; GOLDBOHN, R. A., Intake of conjugated linoleic acid, fat and other fatty acids in relation to postmenopausal breast cancer: The Netherlands cohort study on diet and cancer. **Am. Jour. Clin. Nutr.** n.76, pp. 873-82, 2002.

WILLIAMS, W., MCGIBBON, R., Environmental effect on seed oil percentage and fatty acid composition in white lupin. **J. Agric. Sci.** v.95, pp. 597-602, 1980.

WINK, M. Health promoting activities of non-nutritional factors in lupins. Proceedings of the 11 th International Lupin Conference, México, 2005.

Avaliação dos efeitos do extrato aquoso de sementes de *L. albus* sobre a carcinogênese colorretal, níveis de glicemia e colesterol e resposta imunológica de camundongos *Mus musculus*.

Jaqueline Aparecida de Oliveira¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹, Eliete Luciano², Clarice Sibuya².

¹ Departamento de Biologia, Laboratório de Mutagênese, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CEP.13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

² Departamento de Educação Física, Laboratório de Biodinâmica, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CEP.13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

A cada dia aumenta o interesse de pesquisadores em descobrir em plantas medicinais substâncias que possam atuar como quimiopreventivas na carcinogênese. O *Lupinus albus* (*L. albus*), conhecido popularmente como tremço branco, vem sendo usado na medicina popular, como regulador de níveis de glicemia e colesterol. Embora descrito na literatura que suas proteínas e alcaloides isolados têm potencial para isto, estudos prévios realizados pelo nosso grupo revelaram que o extrato aquoso de *L. albus*, como é utilizado na medicina popular, apresentou hiperglicemia em animais tratados. Sendo assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar os possíveis efeitos, carcinogênicos e/ou anticarcinogênicos do extrato aquoso de *L. albus*, por meio de ensaio de Focos de Criptas Aberrantes, bem como avaliar a resposta das células sanguíneas por meio da contagem diferencial de leucócitos e intensificar a avaliação sobre os efeitos glicêmicos e colesterolêmicos em camundongos da espécie *Mus musculus*. Neste estudo os resultados revelaram que o extrato conseguiu reverter e/ou inibir a progressão das lesões pré-neoplásicas e consequentemente, prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal, induzidas pela DMH, induzir uma hiperglicemia e manter os níveis de colesterol dentro da normalidade, após a administração da DMH. Na contagem diferencial de leucócitos, foi possível observar que o extrato de *L. albus* ocasionou uma imunomodulação das células sanguíneas.

Palavras-chave: Focos de Criptas Aberrantes; imunomodulação; quimioprevenção; Anticarcinogênese e plantas medicinais.

ABSTRACT

Every day increases the interest of researchers in discovering in herbal substances that can act as chemopreventive in carcinogenesis. *Lupinus albus* (*L. albus*), popularly known as white lupine, has been used in folk medicine as a regulator of blood glucose and cholesterol. Although described in the literature and their proteins isolated alkaloids have the potential for this, previous studies by our group showed that the aqueous extract of *L. albus* as used in folk medicine in the treated animals had hyperglycemia. Thus, the aim of this study was to evaluate the possible effects, carcinogenic and/or anticarcinogenic the aqueous extract of *L. albus*, through testing Aberrant Crypt Foci and evaluate the response of blood cells by leukocyte count and intensify the assessment of the effects on glucose and colesterolêmicos mice *Mus musculus*. In this study, the results revealed that the extract was able to reverse and/or inhibit the progression of pre-neoplastic lesions and thus prevent the development of colorectal cancer induced by DMH induce hyperglycaemia and maintain cholesterol levels within the normal range after administration of DMH. In leukocyte count was observed that the extract of *L. albus* immunomodulation caused a blood cells.

Keywords: Aberrant Crypt Foci; immunomodulation; chemoprevention; anticarcinogenesis and medicinal plants.

1. INTRODUÇÃO

Organização Mundial da Saúde (OMS) tem incentivado o estudo de plantas tradicionalmente conhecidas como medicinais, com o objetivo de avaliar cientificamente os benefícios da utilização de medicamentos fitoterápicos e de conhecer, ao mesmo tempo, os riscos de seu uso indevido. Muitos pesquisadores vêm desenvolvendo estudos sobre as propriedades farmacológicas das plantas medicinais, porém ainda faltam evidências sobre a eficácia e a segurança de seu uso (LOGUERCIO et al., 2005). As plantas medicinais são mundialmente empregadas na medicina popular mas, apesar de serem usadas há muito tempo (PINTO et al., 2002), poucas delas apresentam suas constituições químicas e atividades biológicas bem definidas.

O *Lupinus albus* (*L. albus*), conhecido popularmente como tremço branco, é uma leguminosa com conteúdo proteico próximo ao da soja. Esta espécie apresenta em suas sementes um alto teor de ácidos graxos poli-insaturados e ácidos saturados, sendo que os mais importantes deles são o ácido palmítico (cerca de 12%), ácido oleico (cerca de 44%) e o ácido linoleico (cerca de 36%) (FELDHEIM 1990). Segundo este mesmo autor suas sementes são ricas em oligossacarídeos não digeríveis pelo nosso organismo que, como as fibras, influenciam na digestão, atuando na redução da absorção dos açúcares e do colesterol. Os efeitos dos oligossacarídeos e polissacarídeos não digeríveis estão relacionados com a diminuição do risco de desenvolvimento de câncer (KAY, 1978). Dentre os possíveis mecanismos de ação que vêm sendo sugeridos, estão a redução de estrogênios bioativos no sangue, uma vez que dietas ricas em fibras estão associadas com a alteração da flora colônica, atuando na regulação da recirculação enterohepática de estrogênios, de tal forma que a quantidade de estrogênio excretado é aumentada (COHEN, 1999). A casca das sementes de *L. albus*, contém 95% de fibra, onde 77 % delas são fibras insolúveis (FELDHEIM; WISKER, 1986). Também está entre os constituintes das sementes o isoflavonóide genisteína que de acordo com apresenta capacidade de inibir a tirosina, inibindo consequentemente o hormônio responsável pela ativação da via sinalizadora intracelular que culmina na transcrição dos genes responsáveis pela divisão celular que são associados a alguns tipos de tumores e portanto a carcinogênese.

Carcinogênese é o processo que origina uma célula transformada que não possui as características de uma célula diferenciada de qualquer tipo sendo necessária a exposição repetida aos carcinógenos para que haja o desenvolvimento de tumores malignos. O câncer é um importante problema de saúde pública mundial, sendo responsável por mais de 6 milhões de óbitos a cada ano, representando cerca de 12% de todas as causas de morte no mundo

(WHO, 2002). Estimativas de 2012 apontam a ocorrência, de aproximadamente, 518.510 casos novos de cânceres para 2013, sendo o câncer de cólon um dos 5 tipos de maior incidência (INCA, 2012).

Por outro lado a quimioprevenção do câncer pode ser definida como a utilização de compostos químicos específicos, naturais ou sintéticos, com finalidade de prevenir, retardar ou reverter as etapas iniciais do processo de desenvolvimento de neoplasias (WATTEMBERG, 1996; KELLOFF, 2000, NAMASIVAYAM, 2011, MOURA, 2012).

Na medicina popular, as sementes de *L. albus* vêm sendo utilizada, como adjuvante no tratamento do controle dos níveis de glicemia e colesterol, embora estudos prévios realizados por nosso grupo, mostraram que extratos das sementes de *L. albus*, induziram hiperglicemia. Todavia, não existem estudos sobre o potencial pró ou anticarcinogênico dessas sementes. Como os animais tratados apresentaram um aumento na quantidade de fezes produzidas, surgiu o interesse em avaliar os efeitos das sementes de *L. albus* no cólon desses animais e sobre a carcinogênese colorretal induzida pela 1,2-dimetilhidrazina (DMH), bem como, avaliar os efeitos deste vegetal sobre os níveis da glicemia e de colesterol e investigar as respostas das células sanguíneas dos animais tratados, além de determinar e quantificar por meio de cromatografia gasosa alcaloides e ácidos graxos que podem atuar como carcinógeno ou anticarcinógeno no cólon.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.2. Material vegetal

2.1.2.1. Obtenção do Material Vegetal

Sementes da espécie *L. albus* (tremoço branco), adquiridas em comércio de grãos destinados a alimentação humana, foram devidamente armazenadas no Laboratório de Mutagênese da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP) do Instituto de Biociências/Departamento de Biologia/Campus de Rio Claro, até a sua investigação nos ensaios genéticos.

2.1.3. Agentes Químicos

O agente químico utilizado para indução de carcinogênese colorretal foi a 1,2-dimetilhidrazina (DMH; Sigma[®], CAS: n° 306-37-6), concentração de 20mg/kg, diluída em solução de EDTA (0,37mg/ml). A solução foi administrada aos animais pela via intraperitoneal (i.p), na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c).

2.1.4. Animais Experimentais

Foram utilizados, para cada tratamento, camundongos machos (n=5) da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso inicial aproximado de 30 gramas, provenientes da empresa ANILAB[®]. Os animais permaneceram por todo período experimental no biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)- Campus de Rio Claro, Instituto de Biociências. A temperatura do ambiente foi de 22±2°C e umidade relativa do ar de 55±5%, em ciclo claro e escuro de 12 horas. Os animais receberam água mineral e ração Nuvital[®] *ad libitum*, por todo período experimental. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação do Comitê de Ética em Uso animal (CEUA) do IB/UNESP-Rio Claro.

2.1.4.1. Eutanásia dos animais

Neste experimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, método de morte induzida mais indicado para o experimento por não comprometer a fidelidade dos resultados da pesquisa.

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparo dos extratos aquosos de *L. albus*

As sementes de *L. albus* foram trituradas em liquidificador, até ficarem com aspecto de farinha. Após a trituração, a farinha foi misturada a água e essa solução foi submetida à homogeneização, em “mixer”, por 1 minuto, para o preparo do extrato aquoso, nas concentrações de 0,5 mg/kg e 1,5 mg/kg. A preparação das farinhas foi processada semanalmente e os extratos diariamente, sempre no momento da administração para os camundongos. Este procedimento foi adotado para não haver possíveis degradações do extrato ou ação microbiana comumente observadas em soluções aquosas (SIMÕES, et al., 2004). As diferentes concentrações foram administradas aos camundongos, pelo método de gavagem, na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c).

2.2.2. Delineamento Experimental

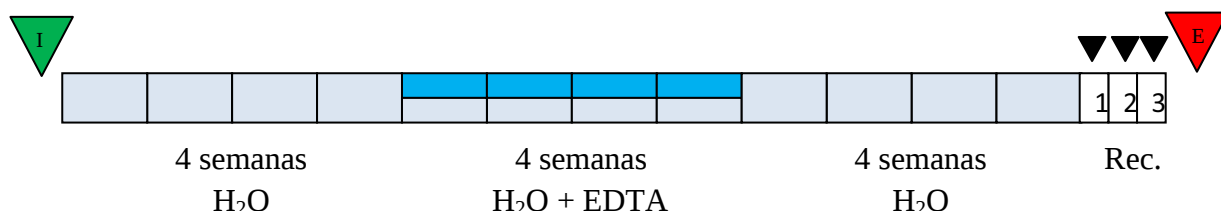
Os experimentos foram realizados, com duas diferentes concentrações do extrato aquoso de *L. albus* (0,5 mg/kg/dia e 1,5 mg/kg/dia), que equivalem, proporcionalmente, a 3 sementes/dia e a 9 sementes/dia para uso humano, devidamente adaptado para o peso dos

camundongos. Os ensaios foram realizados separadamente, para cada concentração. Os animais foram subdivididos em oito diferentes grupos experimentais: o grupo controle negativo, controle positivo e os grupos tratados com extratos aquosos de *L. albus*. Para cada um dos diferentes ensaios e concentrações, foram expostos cinco animais. Os animais foram submetidos ao tratamento por 12 semanas e por 72 horas de recuperação, conforme protocolo sugerido por Mauro et al. (2008), conforme esquematizado no item 2.2.2.1.

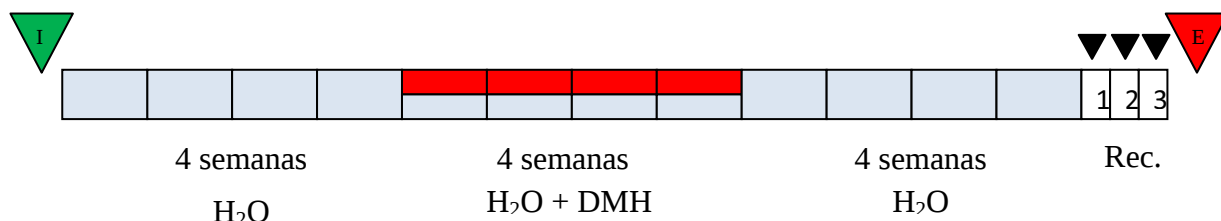
2.2.2.1. Esquema do delineamento experimental

2.2.2.1.1. Grupos Controle

2.2.2.1.1.1. Grupo de Tratamento Controle Negativo

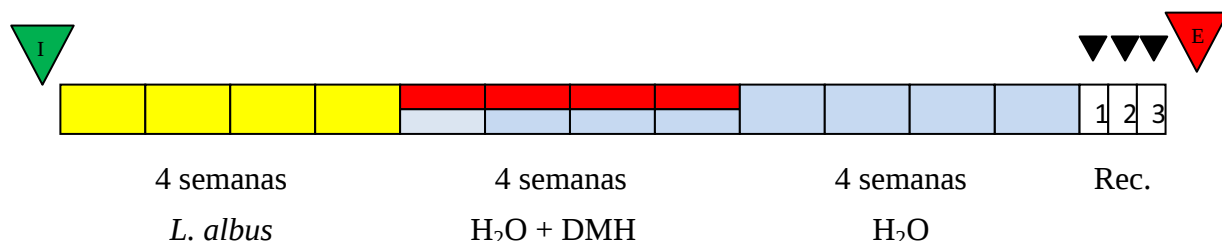


2.2.2.1.1.2. Grupo Tratamento Controle Positivo

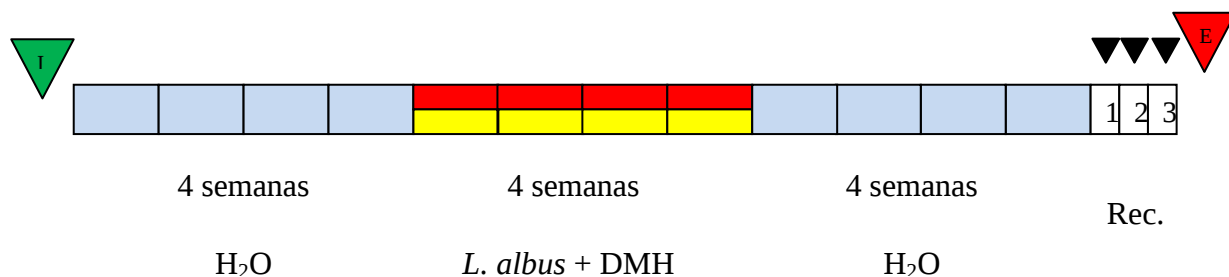


2.2.2.1.2. Grupo de avaliação da Carcinogenicidade e Anticarcinogenicidade do *L. albus*.

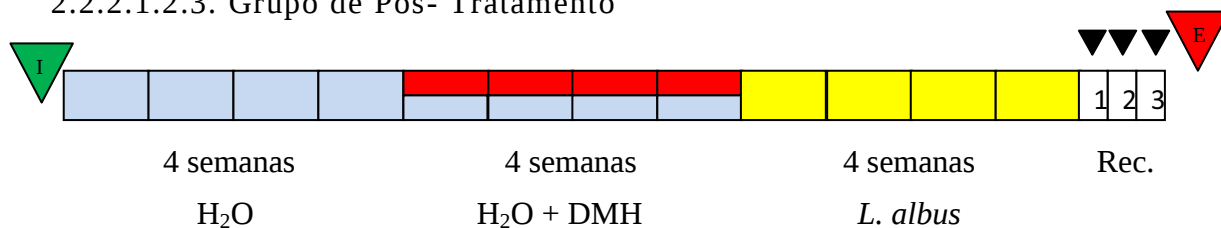
2.2.2.1.2.1. Grupo de Pré-Tratamento



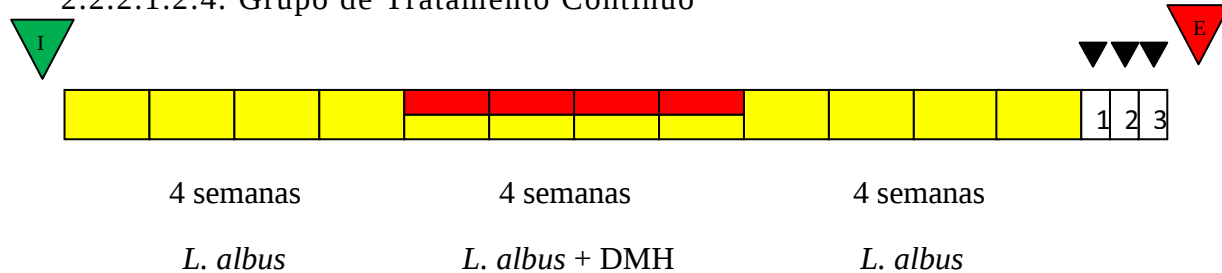
2.2.2.1.2.2. Grupo de Tratamento Simultâneo



2.2.2.1.2.3. Grupo de Pós- Tratamento



2.2.2.1.2.4. Grupo de Tratamento Contínuo



Início do experimento



Eutanásia



Coletas se sangue periférico para contagem diferencial de leucócitos nos períodos de recuperação e para análises bioquímicas



Tratamento com água



Tratamento com *L. albus*



Tratamento com água e EDTA



Tratamento com água e DMH



Tratamento com *L. albus* e EDTA



Tratamento com *L. albus* e DMH

- 1 Período de recuperação, 24 horas
- 2 Período de recuperação, 48 horas
- 3 Período de recuperação, 72 horas

2.2.3. Bioensaios e Análises bioquímicas

2.2.3.1. Contagem diferencial de leucócitos

A coleta do sangue foi feita por meio de punção caudal, retirando-se uma gota de sangue periférico dos animais com o auxílio de uma agulha (30x7). Com as amostras de sangue, foram confeccionados os esfregaços sanguíneos. A coloração das lâminas foi feita por 4 minutos utilizando o corante Leishman, seguido de adição de água destilada. A lâmina foi agitada e deixada nesta solução por mais 10 minutos. Após esse processo, as lâminas foram secas em temperatura ambiente e montadas com lamínula, em resina sintética (Entelan[®]), para serem analisadas (100 leucócitos por animal) em microscópio de luz (objetiva de 100x). A metodologia aplicada na realização da contagem diferencial destas células permitiu determinar o percentual e o número absoluto de linfócitos, neutrófilos, monócitos, eosinófilos e basófilos.

2.2.3.2. Dosagens de glicemia e colesterol

As dosagens bioquímicas de glicemia, colesterol total, LDL, HDL e triglicérides foram feitas com os kits comerciais Laborclin[®], de acordo com as indicações do fabricante. A leitura foi feita por espectrofotometria, utilizando o leitor de placas ASYS- Expert Plus-Analítica.

2.2.3.3. Ensaio de Focos de Criptas Aberrantes (FCA)

Para os ensaios de FCA, foi retirado o intestino grosso dos animais e realizada, com o auxílio de um fio de algodão, a ligadura entre o ceco e o reto. O intestino foi lavado com solução fisiológica 9% (injetado com seringa, para retirada das fezes), seccionados longitudinalmente com uma tesoura e suas extremidades presas com alfinetes emborrachados em placas de isopor[®]. Essa placa foi colocada em solução de formalina tamponada a 10%,

para fixação, por no mínimo 24 horas onde depois foram corados com corante giemsa a 10% e analisados em microscópio em objetiva de 10 x.

2.2.4. ANÁLISES DOS RESULTADOS

2.2.4.1. Análise da redução de danos de FCA

A porcentagem de redução de danos de focos de criptas aberrantes no cólon dos camundongos, ocasionadas pelos extratos de *L. albus*, foi calculada pela seguinte fórmula:

$$\% \text{ RD} = [(N^{\circ} \text{ FCA C+}) - (N^{\circ} \text{ FCA grupo trat.})] / [(N^{\circ} \text{ FCA C+}) - (N^{\circ} \text{ FCA C-})] \times 100$$

Onde: % RD = Porcentagem de Redução de Danos

FCA C+ = Focos de Criptas Aberrantes do Grupo Controle Positivo

FCA C- = Focos de Criptas Aberrantes do Grupo Controle Negativo

FCA grupo trat. = Focos de Criptas Aberrantes dos Grupos tratados com *L. albus*

2.2.4.2. Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas com o software BioEstat 5.0[®]. As variações entre os grupos e as doses foram realizadas por análise de variância ANOVA. Quando houve diferença estatística, foi utilizado o teste de comparação múltipla Tukey, considerando valor de $p < 0.05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Biometria

O peso corporal é um dos parâmetros mais empregados em avaliações toxicológicas, pois pode indicar um efeito precoce de toxicidade de uma determinada substância para organismo exposto a ele (STEVENS; GALLO, 1989; MARUO, 2002). A tabela 1 mostra a relação do peso médio absoluto dos animais, expresso em gramas $\pm$ desvio padrão, no período inicial e final do experimento e o ganho de peso para cada grupo experimentado neste trabalho. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas no peso inicial dos animais tratados, quando estes foram comparados com o grupo controle negativo (CN). Os pesos iniciais dos camundongos experimentados variaram de 27.96 $\pm$ 4.86g a 32.96 $\pm$ 1.68g. Quando o peso final dos animais tratados foi comparado com o CN, houve uma diferença estatisticamente significativa apenas para o grupo de pré-tratamento, na concentração de 1.5 mg/kg/dia.

Quando os pesos iniciais e finais, de cada grupo testado, foram comparados entre si, foi observado que os grupos CN; as duas concentrações do tratamento simultâneo; a concentração de 0.5 mg/kg/dia do pós-tratamento e do tratamento contínuo apresentaram resultados estatisticamente significativos. Quando o ganho de peso dos animais tratados foi comparado com o CN, não houve diferenças estatisticamente significativas entre os ensaios, porém teve, para todos os grupos, um ganho de peso observado durante o período experimental.

Tabela 1: Peso corpóreo, inicial e final e ganho de peso dos camundongos experimentados expostos aos extratos de *L. albus* e aos respectivos controles (CN e CP)

Grupos	Peso Inicial (g)	Peso Final (g)	Ganho de peso (g)
Controle Negativo (CN)	30.68±1.82	35.02±2.71 ^a	4.34±2.00
Controle Positivo (CP)	29.52±2.12	33.75±2.59	4.23±0.79
Pré-Tratamento-0.5mg/kg/dia	30.74±2.48	34.20±6.15	3.46±3.74
Pré-Tratamento-1.5mg/kg/dia	27.96±4.86	33.50±1.41 [*]	5.54±3.04
Tratamento Simultâneo-0.5mg/kg/dia	29.70±2.53	34.10±2.70 ^a	4.40±1.73
Tratamento Simultâneo-1.5mg/kg/dia	28.80±2.26	33.84±2.24 ^a	5.04±3.46
Pós-Tratamento-0.5mg/kg/dia	29.44±1.03	33.70±3.11 ^a	4.26±2.19
Pós-Tratamento-1.5mg/kg/dia	29.20±1.18	34.75±2.21	5.53±3.50
Tratamento Contínuo-0.5mg/kg/dia	32.96±1.68	36.50±1.06 ^a	3.54±1.23
Tratamento Contínuo-1.5mg/kg/dia	32.46±2.26	36±2.44	3.54±0.35

* Estatisticamente significativo quando comparados ao grupo controle negativo (ANOVA e Tukey $p<0.05$)

^a Estatisticamente significativo quando comparados peso inicial e final de cada grupo (ANOVA e Tukey $p<0.05$)

3.2. Peso dos órgãos

Na tabela 2, estão representados os valores médios do peso absoluto, expressos em gramas, dos órgãos coletados dos animais. A análise estatística indicou diferença significativa para o peso médio absoluto do pâncreas dos animais do grupo de pré-tratamento e de pós-tratamento submetidos à concentração de 0.5 mg/kg/dia, quando comparados ao grupo CN. Os demais órgãos não apresentaram diferenças significativas, quando comparadas com o grupo CN.

Tabela 2: Valores médios±desvio padrão da média do peso absoluto dos órgãos dos animais, após o período de experimentação com extratos de *L. albus*

Grupos	Baço	Coração	Fígado	Pâncreas	Pulmão	Rins	Testículo	Tireoide
Controle Negativo (CN)	0.097±0.031	0.180±0.054	1.28±0.232	0.161±0.016	0.241±0.129	0.367±0.104	0.167±0.034	0.216±0.019
Controle Positivo (CP)	0.080±0.019	0.144±0.019	1.18±0.170	0.174±0.031	0.241±0.100	0.333±0.125	0.157±0.017	0.221±0.039
Pré-Tratamento- 0.5mg/kg/dia	0.139±0.062	0.153±0.037	1.33±0.381	0.209±0.021*	0.328±0.305	0.452±0.067	0.150±0.055	0.202±0.066
Pré-Tratamento- 1.5mg/kg/dia	0.121±0.069	0.142±0.012	1.46±0.214	0.213±0.045	0.222±0.003	0.493±0.094	0.215±0.049	0.245±0.075
Tratamento Simultâneo-0.5mg/kg/dia	0.091±0.017	0.154±0.016	1.24±0.236	0.219±0.055	0.223±0.066	0.460±0.070	0.176±0.018	0.232±0.056
Tratamento Simultâneo-1.5mg/kg/dia	0.088±0.018	0.144±0.029	1.11±0.121	0.174±0.031	0.200±0.027	0.433±0.024	0.179±0.011	0.203±0.025
Pós-Tratamento-0.5mg/kg/dia	0.097±0.019	0.147±0.005	1.17±0.070	0.227±0.033*	0.188±0.011	0.405±0.026	0.166±0.015	0.205±0.023
Pós-Tratamento-1.5mg/kg/dia	0.090±0.010	0.144±0.019	1.21±0.230	0.239±0.101	0.199±0.036	0.407±0.047	0.172±0.013	0.223±0.054
Tratamento Contínuo-0.5mg/kg/dia	0.104±0.018	0.154±0.015	1.30±0.197	0.180±0.036	0.252±0.138	0.421±0.081	0.231±0.052	0.206±0.048
Tratamento Contínuo-1.5mg/kg/dia	0.140±0.023	0.197±0.046	1.39±0.132	0.220±0.025	0.238±0.076	0.522±0.037	0.211±0.046	0.252±0.065

Valores médios±desvio padrão da média representados em gramas, * significativo para o teste ANOVA e Tukey (p < 0,05).

Na tabela 3, estão representados os pesos, médio relativo, expressos em gramas dos órgãos dos animais. Foram observados resultados estatisticamente significativos para o pâncreas nos mesmos grupos que apresentaram diferenças para o peso absoluto destes órgãos, (grupos de pré-tratamento e o grupo de pós-tratamento concentração de 0.5 mg/kg/dia), quando comparados ao grupo CN. Esses dados comprovam a existência de diferenças de peso deste órgão.

Em estudo realizados por Grant et al. (1988), foram observados resultados similares de hiperplasia de pâncreas em ratos alimentados com proteína da soja. A hipertrofia pancreática é frequentemente reportada em experimentos com animais de laboratório, que foram expostos a inibidores de protease, embora não haja evidências desses efeitos deletérios para seres humanos (DESHPANDE; NIELSEN, 1987). Os resultados obtidos neste trabalho corroboram os dados de Grant et al., (1988), pois *L. albus* contém em suas sementes inibidores de protease capazes de inibir a atividade da tripsina.

Tabela 3: Valores médios±desvio padrão do peso relativo de órgãos dos animais, após o período de experimentação com extratos de *L. albus*

Grupos	Baço	Coração	Fígado	Pâncreas	Pulmão	Rins	Testículo	Tireóide
Controle Negativo (CN)	0.003±0.0006	0.005±0.0010	0.036±0.006	0.004±0.0007	0.007±0.0040	0.01±0.002	0.005±0.001	0.006±0.0002
Controle Positivo (CP)	0.002±0.0007	0.004±0.0006	0.040±0.006	0.005±0.0008	0.007±0.0030	0.009±0.003	0.005±0.0008	0.006±0.0010
Pré-Tratamento- 0.5mg/kg/dia	0.004±0.0020	0.004±0.0009	0.040±0.004	0.006±0.0011*	0.009±0.0090	0.01±0.0010	0.004±0.0020	0.006±0.0010
Pré-Tratamento- 1.5mg/kg/dia	0.004±0.0020	0.004±0.0005	0.040±0.008	0.01±0.00100	0.006±0.0003	0.01±0.0030	0.005±0.0006	0.007±0.0020
Tratamento Simultâneo-0.5mg/kg/dia	0.003±0.0005	0.004±0.0003	0.040±0.005	0.006±0.0010	0.006±0.0020	0.01±0.0020	0.005±0.0005	0.007±0.0010
Tratamento Simultâneo-1.5mg/kg/dia	0.002±0.0004	0.004±0.0006	0.030±0.003	0.005±0.0009	0.006±0.0007	0.01±0.0009	0.005±0.0003	0.006±0.0005
Pós-Tratamento-0.5mg/kg/dia	0.003±0.0006	0.004±0.0003	0.030±0.002	0.006±0.0010*	0.006±0.0007	0.01±0.0007	0.005±0.0005	0.006±0.0007
Pós-Tratamento-1.5mg/kg/dia	0.002±0.0004	0.004±0.0004	0.030±0.004	0.006±0.0060	0.006±0.0007	0.01±0.0008	0.006±0.0010	0.006±0.0010
Tratamento Contínuo-0.5mg/kg/dia	0.003±0.0005	0.004±0.0004	0.040±0.005	0.004±0.0010	0.007±0.0030	0.01±0.0020	0.006±0.0009	0.006±0.0010
Tratamento Contínuo-1.5mg/kg/dia	0.004±0.0007	0.005±0.0010	0.040±0.002	0.006±0.0040	0.006±0.0010	0.01±0.0010	0.005±0.0006	0.007±0.0010

Valores médios±desvio padrão da média representados em gramas, * significativo para o teste ANOVA e Tukey (p < 0,05).

3.3. Avaliação dos efeitos dos extratos de *L. albus* nos níveis de colesterol e glicemia do soro dos camundongos experimentados

3.3.1. Avaliação dos efeitos Glicêmicos

Na tabela 4 estão representados os resultados da análise de índice glicêmico. Os grupos de tratamento simultâneo, nas duas concentrações testadas (0.5 mg/kg/dia e 1.5 mg/kg/dia), de pós-tratamento e de tratamento contínuo (concentração de 0.5mg/kg/dia), apresentaram resultados estatisticamente significativos, em relação aos resultados observados no grupo CN, apresentando um efeito hiperglicêmico.

3.3.2. Avaliação dos efeitos Colesterolêmicos

3.3.2.1. Colesterol total

Na análise dos níveis de colesterol total, o único grupo experimental que apresentou resultado estatisticamente significativo, em relação ao controle, foi o grupo de pré-tratamento, concentração 1.5 mg/kg/dia. Porém, observando os resultados obtidos nos grupos experimentais, todos eles apresentaram resultados inferiores ao grupo CN, nos mostrando que os extratos de *L. albus* tem potencial anticolesterolêmico, podendo, assim, manter os níveis de colesterol total dentro da normalidade, ou até promovendo uma diminuição destes níveis. Pelos indícios anticolesterolêmicos observados, seria interessante avaliar outras concentrações do extrato de sementes de *L. albus*, para estabelecer uma relação concentração/efeito para esta planta.

3.3.2.2. HDL-Colesterol

Embora os níveis de HDL-colesterol dos tratamentos realizados com os extratos de *L. albus* não foram estatisticamente diferentes do resultado do grupo CN, podemos considerar que os extratos de *L. albus*, nestas condições experimentais, apresentaram resultados positivos, pois conseguiu manter a lipoproteína LDL dentro da normalidade, sem sofrer interferência da DMH.

3.3.2.3. LDL-Colesterol

Os níveis de LDL-colesterol não mostraram diferenças significativas entre o CN e os demais tratamentos realizados neste trabalho. Porém, podemos observar que, com exceção do grupo de pré-tratamento, todos os demais grupos testados apresentam resultados abaixo dos observados para o CN. Estes dados são importantes pois indica que o extratos *L. albus* conseguiu manter a lipoproteína LDL dentro da normalidade.

3.3.2.4. Triglicérides

As análises bioquímicas de triglicerídeos mostraram que não foram observadas diferenças significativas entre os resultados dos animais do grupo CN e dos grupos submetidos aos diversos tratamentos utilizados com extratos das sementes de *L. albus*.

Tabela 4: Avaliação dos efeitos dos extratos de *L. albus* sob os níveis de glicemia e colesterol dos animais tratados.

Parâmetros	C. Neg.	C. Pos.	Tratamentos							
			Pré-Tratamento		Tratamento Simultâneo		Pós-Tratamento		Tratamento Contínuo	
			0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia	0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia	0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia	0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia
Glicemia	75.5±40.2	117±68.0	113.5±45	73.1±41.9	133.3±38.6*	155.2±52*	140.4±46.2*	164±43.7	161.4±35.95*	184±57.7
Colesterol Total	195±21.8	177.7±13.9	167.7±47.02	169.2±0*	151.0±55.4	135.6±64.6	176±61.5	154.6±47.4	171.4±26.23	171.9±32
HDL- Colesterol	39.7±10.9	38.7±5.5	39.6±3.24	39.3±0	39.3±0	40.6±5.56	43.9±6.48	37.7±0.46	37.7±3.24	31.4±4.63
LDL- Colesterol	75.7±55.6	60±33.7	63.4±29.8	96.9±28.7	56.3±15.1	39±8.88	28.5±21	63.8±18.6	49.2±14.3	66.4±19.2
TRIGLICÉRIDES	90.6±30.9	146.6±81.3	104.0±46.8	135.6±38.5	109.2±47.9	82.1±19.39	51.7±38.5	97.9±24.2	170.4±97.37	126.8±90.7

* significativo ANOVA e Tukey p<0.05

Sirtori et al., (2004) mostraram que isolados proteicos de *L. albus* reduziram os níveis de colesterol LDL e triglicerídeos de ratos e de células HepG2, aumentando a atividade do receptor LDL. Como os nossos dados também mostram uma diminuição dos níveis de colesterol, induzida pelos extratos das sementes de *L. albus*, podemos inferir que esses extratos podem atuar na prevenção da hipercolesterolemia, quando usado de forma crônica. Observamos ainda que até quando o organismo é submetido à ação do agente carcinogênico (DMH) o extrato ainda pode ser capaz de melhorar os níveis de colesterol.

3.4. Avaliação do potencial carcinogênico dos extratos de *L.albus*, avaliados por meio de FCA no cólon dos camundongos experimentados.

Na tabela 5, estão apresentados os dados brutos da análise de FCA. Pelos resultados da análise do potencial carcinogênico de *L. albus* no cólon de camundongos tratados, representados em FCA menores ou igual a 3 focos e maiores que 3 focos ($3 \leq \text{FCA} < 3$), podemos observar resultados significativos estatisticamente em relação ao CN, para o grupo de tratamento contínuo (concentração de 1.5 mg/kg/dia) que apresentou 45 $\text{FCA} \leq 3$, quando comparados ao grupo CN.

Tabela 5: Avaliação do potencial carcinogênico do extrato de *L. albus* sob o cólon dos animais tratados

Grupos	Total de FCA ≤ 3 > 3		
Controle Negativo (CN)	3	3	0
Controle Positivo (CP)	44	39*	5
Pré-Tratamento-0.5mg/kg/dia	28	27	1
Pré-Tratamento-1.5mg/kg/dia	6	6	0
Tratamento Simultâneo-0.5mg/kg/dia	39	38	1
Tratamento Simultâneo-1.5mg/kg/dia	56	51	5
Pós-Tratamento-0.5mg/kg/dia	26	22	4
Pós-Tratamento-1.5mg/kg/dia	36	34	2
Tratamento Contínuo-0.5mg/kg/dia	36	34	2
Tratamento Contínuo-1.5mg/kg/dia	47	45*	2

Resultados apresentados em total de FCA ≤ 3 focos e >3 focos

* estatisticamente significativos (ANOVA e Tukey < 0.05)

3.5. Avaliação do potencial anticarcinogênico e quimiopreventivo dos extratos de *L. albus* avaliados por meio de FCA no cólon dos camundongos experimentados

Na análise do potencial anticarcinogênico e quimiopreventivo, representados em total de FCA, e porcentagem de redução de danos (% RD), apresentamos na tabela 6, o grupo de pré-tratamento, na concentração de 0.5 mg/kg/dia, apresentou percentual de 39% de RD e na concentração de 1.5 mg/kg/dia apresentou 82% de RD. O grupo de tratamento simultâneo, na concentração de 0.5 mg/kg/dia, apresentou taxa de RD de 12.2% e, na concentração de 1.5 mg/kg/dia, apresentou resultado de -29.2%. O grupo de pós-tratamento na concentração de 0.5 mg/kg/dia apresentou 44% de RD, na concentração 1.5 mg/kg/dia apresentou RD de 19.5%. O grupo de tratamento contínuo na concentração de 0.5 mg/kg/dia apresentou RD de 20% e na concentração de 1.5 mg/kg/dia apresentou -7.31% de RD.

Diante dos resultados obtidos, pudemos observar que os grupos de pré-tratamento e pós-tratamento, apresentaram redução de danos para ambas as concentrações testadas, para o pré-tratamento o extrato de *L. albus* foi mais eficaz em reduzir os danos causados pela DMH na maior concentração (1.5 mg/kg/dia). Já o grupo de pós-tratamento foi mais eficaz na menor concentração (0.5 mg/kg/dia). Por estes resultados podemos inferir que nestas condições, os extratos de *L. albus* parecem ser mais eficientes para a prevenção de neoplasias colorretais induzidas pela DMH na maior concentração, tendo grandes chances de ser um quimiopreventivo e/ou anticarcinogênico de câncer de cólon. Porém quando o dano é ocasionado pela DMH, o extrato de *L. albus*, apresenta uma maior eficiência de reparo para a menor concentração (0.5 mg/kg/dia), embora, *L. albus* promova uma redução de danos em ambas as concentrações, podendo então ser utilizado como adjuvante em tratamentos de câncer, onde os pacientes recebam algum quimioterápico com potencial carcinogênico.

Nos grupos de tratamento simultâneo e tratamento contínuo a concentração de 0.5 mg/kg/dia apresentou resultados positivos para redução de danos, enquanto que a concentração maior de 1.5 mg/kg/dia apresentou resultado negativo para este parâmetro, o que pode significar que o extrato de *L. albus* para esta concentração não agiu como quimiopreventivo e/ou anticarcinogênico, pois ele induziu FCA quando comparado ao grupo CP, o que indica que o extrato de *L. albus*, na concentração de 1.5 mg/kg/dia pode induzir proliferação de FCA.

Tabela 6: Avaliação do potencial anticarcinogênico do extrato de *L. albus* nos cólon de animais tratados

Grupos	Total de FCA	%RD
Controle Negativo (CN)	3	-
Controle Positivo (CP)	44	-
Pré-Tratamento-0.5mg/kg/dia	28	39%
Pré-Tratamento-1.5mg/kg/dia	6	82%
Tratamento Simultâneo-0.5mg/kg/dia	39	12,2%
Tratamento Simultâneo-1.5mg/kg/dia	56	-29,2%
Pós-Tratamento-0.5mg/kg/dia	26	44%
Pós-Tratamento-1.5mg/kg/dia	36	19,5%
Tratamento Contínuo-0.5mg/kg/dia	36	20%
Tratamento Contínuo-1.5mg/kg/dia	47	-7,31

Representado em porcentagem de redução de danos (%RD)

Numa análise geral, os extratos de menor concentração (0.5mg/kg/dia) foram mais eficientes para reduzir os danos induzidos pela DMH, e o de maior concentração (1.5mg/kg/dia) foi mais eficaz na prevenção dos danos induzidos pela DMH, como pode ser visto pelo o ensaio de FCA. Sendo assim, podemos dizer que *L. albus* foi capaz de prevenir e reduzir a carcinogênese de cólon nas duas concentrações testadas, com melhor resposta (tirando o grupo de pré-tratamento) para a concentração menor. Essas respostas podem ter sido desencadeadas pelos componentes químicos de *L. albus*, que podem ter ação na prevenção de lesões no intestino dos camundongos, tanto por desmutagênese como por bioantimutagênese. A prevenção dos danos pelos extratos de *L. albus*, pode ser devido à presença de fibras que adsorvem os íons de carbono, impedindo assim sua ação deletéria, ou porque o extrato contém substâncias capazes de modular as enzimas envolvidas no reparo dos danos causados pela DMH.

Em roedores, a administração da DMH desencadeia uma reação inflamatória leve e um aumento da proliferação celular na mucosa do cólon (KRUTOVSKIKH; TUROSOV, 1994). Sua aplicação sucessiva resulta na proliferação celular contínua e consequentemente, em um aumento do número de células em fase de síntese de DNA (DESCHNER, 1978). Desta forma, há uma hiperplasia progressiva das criptas e a hipertrofia da mucosa (WIEBECKE et al., 1973; RICHADS, 1977), efeitos estes que podem culminar na formação de lesões pré-neoplásicas que poderiam evoluir para tumores de cólon e reto. No entanto, como os extratos de *L. albus* tem a propriedade de reduzir, indiretamente, esta atividade inflamatória apresentam então uma capacidade anticarcinogênica, diretamente relacionada à inflamação na mucosa intestinal.

Como citado acima, a ação anticarcinogênica dos extratos de *L. albus* pode ser devido à presença das fibras insolúveis neste extrato, especificamente dos oligossacarídeos, como descrito por Feldheim (1994). Os componentes das fibras insolúveis não são absorvidos pelo organismo, permanecendo no intestino grosso, onde servem como fonte de carboidrato para as bactérias intestinais (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002). Esses oligossacarídeos acabam tendo ação estimulatória sobre as bifidobactérias, que são bactérias com capacidade moduladora da expressão da apoptose, evento este anticarcinogênico (REDDY, 1999). Assim, as fibras podem propiciar uma competição benéfica na microflora residente no intestino, devido à estimulação específica dessas bifidobactérias, que, diferentemente das outras bactérias intestinais, produzem pouca ou nenhuma enzima β -glicuronidase. Esta enzima atua ativando metabólitos gliconóides de contaminantes alimentares e aminas heterocíclicas (POOL-ZOBEL et al., 2002; HAULY; MOSCATTO, 2002). Desta forma, a diminuição desta enzima reduz a metabolização destes compostos carcinogênicos, como é o caso da DMH utilizada neste estudo.

No fígado, a DMH, sofre metabolização por hidrólise se transformando em metilazoximetano, que é conjugado com o ácido β -glicurônico e levado até a luz intestinal, agindo sobre a β -glicuronidase bacteriana, que libera o azoximetano, um metabólito ativo da DMH (LAMONT; O'GORMAN, 1978). As bifidobactérias, como dito acima, produzem pouca ou nenhuma enzima β -glicuronidase (POOL-ZOBEL et al., 2002; HAULY; MOSCATTO, 2002). Assim, os oligossacarídeos, por competição, levam a diminuição da metabolização da droga indutora de danos e, conseqüentemente, a uma regressão da carcinogenicidade presente na mucosa colorretal. Outro mecanismo adjuvante, é que esta competitividade da flora bacteriana faz com que as bactérias produtoras de outras enzimas metabolizadoras de pró-carcinógenos tenham seu crescimento diminuído, reduzindo a presença destas enzimas na mucosa colorretal e, por conseguinte, a carcinogenicidade (HAULY; MOSCATTO, 2002).

As propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas parecem estar associadas com modificações benéficas sobre o sistema de biotransformação hepática (CAVIN et al., 2002; HUBER et al., 2003). A quimioprevenção seria a capacidade de alguns agentes modularem a mutagenicidade e/ou a carcinogênese. Quando estas agem interferindo sobre a mutagênese, são considerados antimutagênicos e quando interferem nos processos da carcinogênese, de anticarcinogênicos (DASHWOOD, 2002). As propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas de uma substância podem ser decorrentes da sua capacidade de bloquear o início do processo neoplásico, deter ou reverter a progressão das células iniciadas para

fenótipos malignos, ou ocorrer por diferentes mecanismos que incluem redução da intoxicação por metabólitos carcinogênicos e/ou aumento da desintoxicação (CHEN; KONG, 2004).

Atualmente, tem sido dada uma especial atenção para a identificação do potencial quimioprotetor de compostos naturais sobre danos induzidos no DNA. Knasmuller et al. (2002) estimaram que nos últimos 20 anos, aproximadamente, 25.000 artigos foram publicados na área de anticarcinogênese e que mais de 80 % dos agentes estudados eram de origem vegetal, utilizados na dieta ou com propósitos medicinais. Assim, compostos com atividade anticarcinogênica, presentes em produtos de origem natural e que sejam de fácil obtenção, são de grande relevância para a saúde pública e uma alternativa interessante para ser usada com o intuito de reduzir as taxas de neoplasias (SUAHEYUN et al., 1997).

3.6. Avaliação dos efeitos dos extratos de *L. albus* sobre células sanguíneas dos camundongos experimentados durante os períodos de recuperação

Mesmo quando ocorre uma atividade anticarcinogênica, podem ser observadas lesões genômicas nos organismos. Uma possibilidade de proteção do organismo para estes eventos, seria a destruição das células, responsáveis por esse processo. A distinção das células malignas poderia ser feita, então por linfócitos, que são células da linhagem branca do sangue, responsáveis pelo sistema de defesa do organismo. Assim, em nosso estudo, foi dada uma atenção especial à contagem diferencial de leucócitos, para avaliar a resposta dos extratos de *L. albus* em células sanguíneas nos períodos de recuperação dos tratamentos.

Pela análise diferencial dos leucócitos, realizada neste trabalho, podemos observar que os extratos das sementes de *L. albus* não levaram a grandes alterações na constituição sanguínea da série branca em relação ao CN. Porém, foi observado que, de acordo com os valores de referência para linfócitos, houve alteração dos índices para os ensaios de recuperação de 24 horas para o pós-tratamento e tratamento contínuo (concentrações maiores). A contagem de neutrófilos mostrou que houve discrepância dos valores de referência para todos os grupos da coleta de 24 horas. O tratamento de 48 horas mostrou que a maioria dos ensaios apresentou valores inferiores aos de referência, com exceção do pré-tratamento, tratamento simultâneo, e tratamento contínuo (concentração maior) e pós-tratamento (concentração menor). Para a análise de 72 horas, também registramos porcentagens de neutrófilos inferiores aos valores de referência, com exceção para o tratamento simultâneo e tratamento contínuo (menor concentração) e pré-tratamento (concentração maior). Para a contagem de monócitos foi observada uma alteração, para todos

os ensaios de 24, 48 e 72 horas inclusive para o CN. Assim, pela comparação dos valores em relação ao controle houve diferença apenas para o pós-tratamento (coleta de 24 horas- concentração maior); pré-tratamento (48 horas- concentração menor) e para tratamento contínuo (48 horas- menor concentração). Para a contagem dos eosinófilos e basófilos não foi observado valor fora do valor de referência, para nenhum dos indivíduos tratados com os extratos de *L. albus*.

Os leucócitos desempenham um papel de defesa do organismo e cada subtipo é responsável por funções específicas que, em conjunto, estruturam o sistema imune. Os linfócitos compreendem de 70 a 80% da contagem diferencial de leucócitos em camundongos (HEDRICH, 2004; WEISS; WARDROP, 2010). Os monócitos são responsáveis pela fagocitose e destruição de agentes invasores, sendo, por exemplo, a aderência dos monócitos à superfície bacteriana a primeira etapa da ativação da resposta imunológica (BRANDT et al., 2003). Os neutrófilos são células responsáveis por fagocitar e destruir bactérias e fungos, presentes como resposta à processo inflamatório agudo (VALDERS; FIBBE, 2005). Os eosinófilos desempenham um papel importante na mediação de respostas inflamatórias associadas a alergias, defesa contra parasitas e neoplasias. Essas células apresentam propriedades tóxicas em testes *in vitro* têm a capacidade de destruir protozoários e células tumorais (SANDERSON, 1992). Os basófilos são células efetoras de reações a hipersensibilidade imediata, como asma, rinite alérgica e urticária (GALLI, 1993).

Tabela 7. Efeitos dos tratamentos realizados com extratos de *L. albus* sobre as células sanguíneas, após 24, 48 e 72 horas (períodos de recuperação)

Parâmetros	Val. de Ref.	C. Neg.	C. Pos.	Pré-Tratamento		Tratamento Simultâneo		Pós-Tratamento		Tratamento Contínuo	
				0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia	0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia	0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia	0.5mg/kg/dia	1.5mg/kg/dia
24 horas											
Linfócitos	70-80%	76.8±4.43	73.75±11.75	73.2±10.66	75±2.82*	80.4±5.85	74.8±7.59	75±6.68	83.5±10.11	80.6±7.95	84.33±2.88
Neutrófilos	20-30%	16.4±4.21	19±10.64	19.4±11.41	16.5±2.12	11.6±3.91	18.4±6.30	18.8±10.98	11.5±7.14	15±5.38	13.33±3.51
Monócitos	0-2%	4.4±2.07	5±0.81	5.4±2.50	7±0	5.4±2.30	3.8±2.16	4.6±1.51	3±1.63	2.4±2.79	1.33±0.57*
Eosinófilos	0-7%	2.2±0.83	3.25±2.21	1.8±1.09	1.5±0.70*	2.4±1.34	2.4±1.51	1.6±1.14	2±1.82	2.8±2.58	1±1*
Basófilos	0-1%	0.2±0.44	0±0	0.2±0.44	0±0	0.2±0.44	0.6±1.34	0±0	0±0	0±0	0±0
48 horas											
Linfócitos	70-80%	76.8±4.43	73.75±11.75	73.2±8.67	72.5±24.74	79±10.22	72.4±5.89	73.4±12.36	79.75±7.41	80.6±5.45	69.5±3.41
Neutrófilos	20-30%	16.4±4.21	19±10.64	19.6±10.92	23.5±24.74	15.8±7.91	21.8±7.19	20.8±13.88	15.75±5.18	16.6±4.50	24.75±6.99
Monócitos	0-2%	4.4±2.07	5±0.81	5±3.08	3.5±0.70*	5±2.34	4.4±2.30	4±1.87	2.75±3.59	1.8±0.83*	3.25±2.87
Eosinófilos	0-7%	2.2±0.83	3.25±2.21	2.2±1.78	0.5±0.7	1.8±1.30	1.4±0.54	1.8±0.83	1.75±1.70	1±1	2.5±2.64
Basófilos	0-1%	0.2±0.44	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0
72 horas											
Linfócitos	70-80%	76.8±4.43	73.75±11.75	77±4.74	62.5±10.60*	67±14.3	76.8±6.14	71.2±14.07	81.5±6.55	72.6±9.28	79±8.98
Neutrófilos	20-30%	16.4±4.21	19±10.64	17.4±6.87	30±14.14	26±15.74	17±6	21.2±13.02	11.75±6.75	26.4±12.09	18.25±8.18
Monócitos	0-2%	4.4±2.07	5±0.81	4.4±1.14	4.5±0.70	5.25±2.21	3±1.87	3.4±1.51	5.25±4.57	3.6±3.20	2±0.81
Eosinófilos	0-7%	2.2±0.83	3.25±2.21	2.4±2.19	3±2.82	1.75±1.5	3.2±2.8	4.2±3.27	1.5±1.29	1.4±1.67	0.75±0.95
Basófilos	0-1%	0.2±0.44	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0	0±0

* Estatisticamente significativo quando comparados ao grupo controle negativo (ANOVA E Tukey, p<0.05)

Valores de referência: WEISS; WARDROP., Veterinary hematology, cap. 17., ed. Wiley-Blackwell, 2010.

Frente a essas considerações, verifica-se que o extrato de *L. albus* foi eficiente em promover imunomodulação com consequente aumento dos parâmetros celulares que podem estar, direta ou indiretamente, relacionadas à retirada de células com instabilidade genômica do organismo dos camundongos. Sendo assim, pela presente avaliação hematológica, podemos observar que houve um aumento significativo de monócitos para os grupos tratados com extratos de *L. albus*, bem como de eosinófilos para alguns grupos. Desta forma, podemos considerar que ocorreu uma modificação na resposta imunológica, frente à proliferação de células com possíveis lesões no DNA causadas pela DMH. Pelos nossos resultados os componentes dos extratos de *L. albus* podem favorecer o aumento da fagocitose e a eliminação de células iniciadas do processo de instabilidade genética e, por consequente, reduzir as possibilidades de progressão do câncer. Podemos inferir ainda que *L. albus* pode se caracterizar em um excelente quimiopreventivo de carcinogênese de cólon, corroborando os resultados encontrados no ensaio de anticarcinogenicidade de cólon.

4. CONCLUSÃO

No presente trabalho observamos que os extratos de *L. albus* não apresentaram eficiência na redução dos níveis glicêmicos, quando os animais foram submetidos também ao agente carcinogênico DMH. Foi observado ainda em efeito contrário, onde os indivíduos que receberam tratamento com extratos apresentaram uma hiperglicemia, com exceção do pré-tratamento (concentração de 0.5mg/kg/dia), que apresentou índices normais de glicose. Para os níveis de colesterol, o extrato mostrou um melhor resultado para os grupos de tratamento simultâneo (concentração de 1.5mg/kg/dia) e pré-tratamento (concentração de 0.5mg/kg/dia) indicando que o extrato de *L. albus*, quando administrado juntamente com a DMH, apresenta um efeito benéfico e é dose-dependente. Quando o extrato foi administrado após a exposição na concentração menor ele se mostrou mais eficiente em conseguir manter os níveis de colesterol dentro da normalidade.

Na análise das lesões colorretais induzidas pelo carcinógeno DMH, os resultados obtidos demonstraram que os extratos contribuíram para a reorganização morfológica do epitélio intestinal, reduzindo a formação de FCAs. Sendo assim, podemos dizer que o extrato de *L. albus* agiu de maneira quimiopreventiva, pois conseguiu reverter e/ou inibir a progressão das lesões pré-neoplásicas (FCA) e, consequentemente, prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal. Nas análises da resposta das células sanguíneas, os extratos de *L. albus* induziram um aumento de monócitos, componente do sangue capazes de proteger o organismo de agressões ao DNA, eventos estes comuns na carcinogênese.

5. REFERÊNCIAS

- BRANDT, C. T.; LEITE, C. R. C.; CASTRO, R. M.; BRANDT, F. C.; CASTRO, F. M. M.; CASTRO, C. M. M. B., Aderência e atividade microbicida de monócitos em portadores de esquistossomose mansônica na forma hepatoesplênica cirúrgica. **Acta Cir Bras.**, v.18, n.2, pp.143-153, 2003.
- CAVIN, C.; HOLZHAUSER, D.; SCHARF, G.; CONSTABLE, A.; HUBER, W.W.; SCHILTER, B. Cafestol and Kahweol, two coffee specific diterpenes with anticarcinogenic activity. **Food Chem. Toxicol.**, v. 40, pp. 1155-1163, 2002.
- CHEN, C.; KONG, A.N.T. Dietary chemopreventive compounds and ARE/EpRE signaling. *Free Radic. Biol. Med.*, v. 36, pp. 1505-1516, 2004.
- Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Manual para técnica em bioterismo, 1996. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br>. Acesso em Fevereiro de 2013.
- COHEN, L. A., Dietary fiber and breast cancer. **Anticancer Res.**, v.19, pp. 3685-3688, 1999.
- DASHWOOD, R. H., Modulation of heterocyclic amine-induced mutagenicity and carcinogenicity: an “A to Z” guide to chemopreventive agents, promoters, and transgenic models. **Mut. Res.**, n. 511, pp.89-112, 2002.
- DESCHNER, E. E., Early proliferative defects induced by six weekly injections of 1,2-dimethylhydrazine in epithelial cells of mouse distal colon. **Z. Krebsforsch.**, v. 91, pp.205-16, 1978.
- DESHPANDE, S. S.; NIELSEN, S. S. In vitro digestibility of dry bean (*Phaseolus vulgaris* L.) proteins: the role of heat-stable protease inhibitors. **Journal of Food Science.**, v.52, n.5, pp.1330-1334, 1987.
- FELDHEIM, W.; WISKER, E., Use of lupin seed hull for enrichment with dietary fibre, Anon., Proc. **IV. Int. Lupin Conf. Geraldton.**, pp.298, 1986.

FELDHEIM, W., Use of lupins as source of lipids and dietary fibre in human nutrition, Proc. **VI Int. Lupin Conf.**, pp.124. 1990.

FELDHEIM, W., Fermentation of lupin fibre, **VII Int. Lupin Conf.**, pp. 445, 1994.

FELDHEIM, W., The use of lupins in human nutrition. Proc. **IX Int. Lupin Conf.**, 1999.

GRANT, G., WATT, W. B., STEWART, J. C., BARDOCZ, S., PUSZTAI, A. Intestinal and pancreatic responses to dietary soyabean (Glycine max) proteins. **Biochemical Society Transactions.**, v.16, n.4, pp.610-611, 1988.

HAULY, M. C.; MOSCATTO, J. A.; Inulin and Oligofructosis: a review about functional properties, prebiotic effects and importance for food industry. **Sem: Ciências Exatas e Tecnologia.**, v. 23, pp. 105-118, 2002.

HEDRICH, H., **The Laboratory Mouse.**, Ed. Elsevier Ltd. cap, 17, pp.271-286, 2004.

HUBER, W. W.; SCHARF, G.; NAGEL, G.; PRUSTOMERSKY, S.; SCHULTEHERMANN, R.; KAINA, B., Coffee and its chemopreventive components kahweol and cafestol increase the activity of O-methylguanine-DNA methyltransferase in rat liver – comparison with phase II xenobiotic metabolism. **Mutat. Res.**, v.522, p. 57-68, 2003.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA), Estimativa 2012 e 2013, disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>, acesso em Fevereiro de 2013.

KAY, R. M.; STRASBERG, S. M., Origin, chemistry, physiological effects and clinical importance of dietary fibre. **Clin Inest Med.**, n.1, pp.9-24, 1978.

KNASMULLER, S.; STEINKELLNER, H.; MAJER, B. J.; NOBIS, E. C.; SCHARF, G.; KASSIE, F., Search for dietary antimutagens and anticarcinogens: methodological aspects and extrapolation problems. **Food Chem. Toxicol.**, n.40, pp. 1051-1062, 2002.

KELLOFF, G. J., Progress in Cancer Chemoprevention: Development of Diet-Derived Chemopreventive Agents. **J. Nutr.** v.130, pp.467-471, 2000.

KRUTOVSKIKH, V. A.; TUROSOV, V. S. Tumors of intestines., Pathology of tumors in laboratory animals., 2° ed., v.2, pp. 195-211, 1994.

LAMONT, J. T.; O'GORMAN, T. A. Experimental colon cancer. **Gastroenterology.**, v.75, pp.1157-69, 1978.

LOGUERCIO, A. P.; BATTISTIN, A.; VARGAS, A. C.; HENZEL, A.; WITT, N. M., Atividade antibacteriana de extrato hidro-alcoólico de folhas de jambolão (*Syzygium cumini* (L.) Skells), **Ciência Rural**, v.35, n.2, pp. 371-376, 2005.

MARUO, V. M.; **Estudo dos possíveis efeitos tóxicos da exposição à *Solanum lycocarpum* em ratos adultos e a sua prole.** Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação da faculdade de medicina veterinária e zootecnia da Universidade de São Paulo, 2002.

MAURO, M. O., **Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antimutagênicos e anticarcinogênicos do frutooligosacarídeo inulina in vivo.** Trabalho de Conclusão de Curso. Unifil – Londrina – Paraná, 2008.

MOURA, N, A., **Efeitos da ingestão de Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) sobre o processo de carcinogênese de cólon induzido pela 1,2-dimetilhidrazina em ratos Wistar.** Dissertação de mestrado apresentado ao Instituto de biociências, UNESP- Botucatu, 2012.

NAMASIVAYAM, N. Chemoprevention in experimental animals., **Science**, v.1215, pp. 60–71, 2011.

PINTO, C. A.; BOLZANI, V. S.; LOPES, N. P.; EPIFANIO, R. A.; Produtos naturais: atualidade, desafios e perspectivas. **Química Nova**, vol. 25, n.1, pp.45-61, 2002.

POOL-ZOBEL; B. VAN LOO, J.; ROWLAND, I.; ROBERFROID, M.B.Experimental

evidences on the potential of prebiotic fructans to reduce the risk of colon cancer. **British J. Of Nutr.**, v.87, pp.273-281, 2002.

PUTNAM, D. H.; OPLINGER, E. S.; HARDMAN, L. L.; DOLL, J. D., *Lupine, alternative Field Crops Manual*, 1989. Disponível em: <http://www.hort.purdue.edu/NEWCROP/AFCM/lupine.html>, Acesso em 20/03/2013.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, M. A.; OKSMAN-CALDENTY, M. K.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K., Development of functional ingredients for gut health. **Trends in food Science & technology**, v.13, n.1, pp. 3-11, 2002.

REDDY, B.S.; Possible Mechanisms by Which Pro- and Prebiotics Influence Colon Carcinogenesis and Tumor Growth. **J. Nutr.**, v. 129, pp. 1478-1482, 1999.

RICHARDS, T. C., Early changes in the dynamics of crypt cell populations in mouse colon following administration of 1,2- dimethylhydrazine. **Cancer Res.**, v. 37, pp. 1680-1685, 1977.

SANDERSON, C. J., Interleukin-5, eosinophils, and disease – **Blood, The Journal of The American Society of Hematology**, v.79, n.12, pp. 3101-3109, 1992.

SUAHEYUN, R.; KINOCHI, T.; Arimoch, H., VINTEKETKUMMUEN, U.; OHNISHI, Y., inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* stapf) on formation of azoxymethane- induced, DNA aducts and aberrant crypt foci in the rat colon. **Carcinogenesis**, v.18, pp.949-955, 1997.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; da SILVA FILHO, A. A.; de SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A . E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIN, Y. M. Effect of Brazilian Green própolis on the production of oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, Lausanne, v.94, pp.59-65, 2004.

SIRTORI, C. R.; LOVATI, M. R.; MANZONI, C.; CASTIGLIONI, S.; DURANTI, M.; MAGNI, C.; MORANTI, S.; D'AGOSTINA, A.; ARNOLDI, A., Proteins of white lupin

seed, a naturally isoflavone-poor legume, reduce cholesterolemia in rats and increase LDL receptor activity in HepG2 cells. **J. Nutr.** n.134, pp. 18-23, 2004.

STEVENS, K.R.; GALLO, M. A., Practical considerations in the conduct of chronic toxicity studies . In: Hayes, A. M. Principles and methods of toxicology, 2° ed. **Raven Press.**, pp.237-250, 1989.

WATTENBERG, L. W., Chemoprevention of Cancer, **Prev. Med.** v.25, n.1, pp.44-45, 1996.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J., **Veterinary Hematology.** 6° ed. Iowa: Willey Blackwell, 1232p, 2010.

WIEBECKE, B.; KREY, B.; LÖHRS, U. Morphological and autoradiographical investigations on experimental carcinogenesis and polyp development in the intestinal tract of rats and mice. **Virchows Arch. Pathol. Anat.**, v.360, pp.179-193, 1973.

WINK, M., Health promoting activities of non-nutritional factors in lupins. Proceedings of the XI International Lupin Conference, México, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev. Panam. Salud Publica.* v.12, n.5, pp. 366-370, 2002.

Avaliação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos, antigenotóxicos e antimutagênicos do *Lupinus albus* (*L. albus*), por meio de ensaio do micronúcleo (MN) em medula óssea de camungongos *Mus musculus*.

Jaqueline Aparecida de Oliveira¹, Maria Aparecida Marin-Morales¹.

¹ Departamento de Biologia, Laboratório de Mutagênese, Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista (UNESP), Av. 24-A, 1515, CEP.13506-900, Rio Claro, SP, Brasil.

RESUMO

O uso de plantas medicinais é uma prática muito antiga e utilizada pela maioria dos povos de todo o mundo. *Lupinus albus*, conhecido popularmente como tremoço branco, vem sendo utilizado como fitoterápico pelo uso popular de suas sementes cruas. Embora descrito na literatura que suas substâncias isoladas têm potencial antiglicêmico e controlador dos níveis de colesterol, não se tem qualquer informação científica sobre efeitos tóxicos, citotóxicos genotóxicos e mutagênicos dos componentes químicos de suas sementes. As plantas medicinais podem representar sérios riscos à saúde, principalmente quando não se conhecem seus efeitos adversos, tampouco as suas propriedades químicas e farmacológicas. Plantas com atividades biológicas, embora continuem sendo utilizadas pela população, precisam ser melhores estudadas, pois podem apresentar propriedades antibiológicas e, assim comprometer a saúde do usuário. A planta *L. albus* apresenta muitos compostos tóxicos, como os alcaloides quinolizidínicos e as lectinas que, se ingeridos em excesso, podem comprometer as atividades celulares e consequentemente o organismo, como um todo. Em estudo anterior pudemos evidenciar através de ensaios fitoquímicos por meio de cromatografia gasosa a presença da lupanina, um alcaloide conhecido pela sua ação carcinogênica para rins, pulmões e fígado. Também foi possível evidenciar ácidos graxos, além de na literatura encontrar descrições de altas porcentagens de fibras insolúveis. Por isso, esta planta deve ser melhor avaliada, inclusive quanto ao seu potencial antimutagênico, para possível uso em enfermidades ou para auxiliar na prevenção de doenças. Na medicina popular, são utilizadas, para fins terapêuticos, 3 sementes cruas ao dia, porém em nossos estudos testamos também uma quantidade de sementes equivalente a 9 sementes ao dia, para simular uma super dosagem dos componentes destas sementes. O objetivo deste trabalho foi avaliar, os possíveis efeitos tóxicos, citotóxicos, genotóxicos e antigenotóxicos, mutagênicos e antimutagênicos do *L. albus*, por meio de ensaios de MN em medula óssea de camundongos da espécie *Mus musculus*. Foi possível observar efeito genotóxico e mutagênico no uso crônico, para a concentração equivalente a 9 sementes ao dia, no protocolo de antigenotoxicidade e antimutagenicidade foi possível observar efeitos benéficos para as duas concentrações testadas. Porém, foi encontrado em análise macroscópica dos órgãos, tumores no fígado e nos rins do grupo tratado sub-crônico, no pulmão do grupo pré-tratado, nos rins do grupo tratado simultaneamente e no fígado do grupo pós-tratado com *L. albus*.

Palavras-chave: Extrato vegetal; Tremoço branco; Micronúcleo; Eritrócitos policromáticos; Eritrócitos normocromáticos; Tumorigênese.

ABSTRACT

The use of medicinal plants is a very ancient practice and used by most people around the world. *Lupinus albus*, white lupine popularly known as, has been used as herbal medicine for the popular use of its raw seeds. Although described in the literature that its isolated compounds have potential antiglicêmico controller and cholesterol levels, do not have any scientific information on toxic effects of cytotoxic genotoxic and mutagenic chemicals from its seeds. Medicinal plants can pose serious health risks, especially when there are no known adverse effects, nor their chemical and pharmacological properties. Plants with biological activities, although still being used by the population, need to be better studied, because they can have properties antibiológicas and thus compromise the health of the user. The plant *L. albus* has many toxic compounds such as lectins and quinolizidine alkaloid, if ingested in excess, can compromise cellular activities and hence the organism as a whole. In a previous study we observed through testing phytochemicals by gas chromatography lupanine the presence of an alkaloid known for its carcinogenic action for kidneys, lungs and liver. It was also possible to demonstrate fatty acids, plus find descriptions in the literature of high percentages of insoluble fiber. Therefore, this plant should be better evaluated, including regarding their antimutagenic potential for possible use in diseases and to help prevent disease. In folk medicine, are used for therapeutic purposes, three raw seeds per day, but our studies also tested in a quantity of seed to seed equivalent to 9 days, to simulate an overdose of the components of these seeds. The aim of this study was to evaluate the possible toxic effects, genotoxic and antigenotoxic, mutagenic and antimutagenic *L. albus* by testing MN in bone marrow of mice of the species *Mus musculus*. It was observed genotoxic and mutagenic in chronic use, for the concentration equivalent to 9 seeds per day, the protocol antigenotoxicity and antimutagenicity was observed beneficial effects for the two concentrations tested. However, macroscopic examination was found in the organs, tumors in the liver and kidneys from the group treated sub-chronic lung in the group pretreated group kidney and liver simultaneously treated group post-treated with *L. albus*.

Keywords: plant extract, white lupine, micronucleus, polychromatic erythrocytes; normochromatic erythrocytes; Tumorigenesis.

1. INTRODUÇÃO

Apesar da ampla utilização das plantas medicinais pela população, devido a um conceito já estabelecido de inocuidade (FONSECA, 2008), são encontradas poucas informações sobre os constituintes químicos e riscos que certas plantas representam para a saúde humana (BJELDANES; CHANG, 1977; WEISBURGER, 1979; GOGGELMANN; SCHIMMER, 1986). Muitas das plantas utilizadas na medicina popular podem apresentar substâncias químicas com potencial mutagênico e ou carcinogênico (AMES, 1983; KONSTANTOPOULOU et al., 1992; TAVARES, 1996), efeitos estes suficientes para restringir o seu uso na terapêutica. Muitas plantas utilizadas pela população, além de apresentar propriedades farmacológicas, podem, simultaneamente, causar alterações no DNA (MARQUES et al., 2003).

Lupinus albus, conhecido como tremço branco, é uma planta anual, herbácea, adaptada a climas temperados e subtropicais, pertencente à família Fabaceae (AGRO PASTO SEMEAR; LUP INGREDIENTS). Dentre os muitos componentes nutricionais encontrados nas sementes desta planta, estão alcaloides quinolizidínicos (QAs), como a lupanina, esparteína, lupinina, isolupanina, angustifolina e L-17-hidroxilupanina, sendo os dois primeiros considerados os mais tóxicos e o último, aproximadamente, dez vezes menos tóxico que os primeiros (SILVA et al., 1991; SALDAÑA et al., 1998).

Os estudos de genotoxicidade e mutagenicidade com plantas medicinais têm crescido com o aumento do seu uso terapêutico e pelo o interesse em comprovar a eficácia de suas propriedades farmacológicas (JIMÉNEZ et al., 2005). Um composto é definido como genotóxico quando tem a habilidade de alterar a molécula de DNA e transmitir essa alteração à descendência. Sendo assim, as alterações que perturbam o genoma, sejam elas mutagênicas ou não, são consideradas genotóxicas (FAIRBAIRN et al., 1995). Mutações em células somáticas podem estar envolvidas na patogenicidade de algumas doenças crônicas degenerativas, tais como as cardiovasculares, neurodegenerativas, além dos processos de carcinogênese (DE FLORA et al., 1996; ANDREASSI et al., 2000; ARUOMA, 2003; ROSS; MARGOLIS, 2005).

As propriedades de muitos princípios ativos de plantas podem ter ação sobre o material genético de outros organismos. Assim, há um interesse atual de se avaliar, além das propriedades mutagênicas destes compostos, as suas propriedades antimutagênicas (BARRAI et al., 1992; KAREKAR et al., 2000; SILVA, 2008). Alguns estudos têm demonstrado a presença de compostos naturais com potencial antimutagênico e ou anticarcinogênico

(LOHMAN et al., 1991). O termo antimutagênese está relacionado com a capacidade de redução da frequência ou da taxa de mutações espontâneas ou induzidas, independentemente dos mecanismos envolvidos (WATERS et al., 1996). Os mecanismos de ação antimutagênica são classificados em duas categorias: desmutagênese e bio-antimutagênese. Na desmutagênese, os agentes protetores, ou antimutagênicos, são capazes de inativar um agente mutagênico por ação direta, seja ela química ou enzimática, após o processo de metabolismo ou, até mesmo, pelo sequestro ou adsorção de agentes mutagênicos e radicais livres, impedindo sua ligação ao DNA (KADA; SHIMOI, 1987; FERGUSON, 1994; DE FLORA, 1998). Na bio-antimutagênese, os antimutagênicos atuam como moduladores do reparo e da replicação do DNA, agindo em nível celular aumentando a fidelidade na replicação, estimulando o reparo livre de erro ou ainda inibindo os sistemas de reparo sujeitos a erro (HARTMAN; SHANKEL, 1990; DE FLORA, 1998; SIMIC et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2006).

Há um crescente interesse na descoberta de compostos com atividade antimutagênica, uma vez esses que agentes antimutagênicos podem ser empregados para a prevenção da formação de metabólitos mutagênicos, inativação de agentes mutagênicos, por meio de enzimas ou componentes celulares dos tecidos, neutralização de lesões pré-mutagênicas e modulação dos mecanismos que aumentam a inativação metabólica de compostos mutagênicos (CHEN; YEN, 1997; YANG et al., 2000). Considerando que os agentes mutagênicos estão intrinsecamente ligados à carcinogênese (BUTTERWORTH, 2006), é cada vez mais necessária a identificação de agentes que possam inibir possíveis mutações (SIMIC et al, 1998).

Como as sementes de *L. albus* são consumidas cruas pela população, como adjuvante dos níveis de colesterol e glicemia e, sabendo dos constituintes químicos, como os alcaloides quinolizidínicos (QAs) presentes na planta quando consumida crua, este trabalho teve por objetivo avaliar os seus efeito genotóxicos e mutagênicos assim como seu possível efeito antígeno tóxico e antimutagênico, sob medula óssea do camundongo *Mus musculus*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Material

2.1.2. Material vegetal

2.1.2.1. Obtenção do Material Vegetal

Sementes da espécie *L. albus* (tremoço branco), adquiridas em comércio de grãos destinados a alimentação humana, foram utilizadas para a preparação de extratos aquosos, a serem testados em ensaios realizados com o organismo teste camundongos *Mus musculus*.

2.1.3. Agentes Químicos

O agente químico utilizado para indução de micronúcleo, nos grupos controle positivo e nos ensaios de mutagenicidade e antimutagenicidade, foi a 1,2-dimetilhidrazina (DMH; Sigma[®], CAS: n° 306-37-6) na concentração de 20mg/kg, diluída em solução de EDTA (0,37mg/ml). A solução foi administrada aos animais por via intraperitoneal (i.p), na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c).

2.1.4. Animais Experimentais

Foram utilizados, para cada tratamento, camundongos machos (n=5) da espécie *Mus musculus*, linhagem Swiss, com peso inicial aproximado de 30 gramas, provenientes da empresa ANILAB[®]. Os animais permaneceram por todo período experimental no biotério da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP)- Campus de Rio Claro, Instituto de Biociências. A temperatura do ambiente foi mantida a 22±2°C e umidade relativa do ar a 55±5%, em ciclo claro e escuro de 12 horas. Os animais receberam água mineral e ração Nuvital[®] *ad libitum*, por todo período experimental. Os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com os princípios éticos do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) e com a aprovação do Comitê de Ética em Uso animal (CEUA) do IB/UNESP-Rio Claro.

2.1.4.1. Eutanásia dos animais

Neste experimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, sem a utilização de meios analgésicos, devido ao fato da eutanásia química poder interferir na fidelidade dos resultados (EVRARD, 1997; PECAUT, 2000)

2.2. MÉTODOS

2.2.1. Preparo dos extratos aquosos de *L. albus*

Sementes de *L. albus* foram trituradas em liquidificador, até ficarem com aspecto de farinha. A farinha obtida foi misturada a água e essa solução foi submetida à homogeneização em “mixer”, por 1 minuto, para o preparo do extrato aquoso, nas concentrações de 0,5 mg/kg e 1,5 mg/kg. A preparação das farinhas foi realizada semanalmente e os extratos foram

preparados sempre no momento da administração para os camundongos. Uma vez que extrato aquoso é suscetíveis à degradação e a contaminação microbiana, inerente a soluções aquosas (SIMÕES, et al., 2004). As administrações dos extratos aos camundongos foram feitas pelo método de gavagem, na proporção de 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c).

2.2.2. Delineamento Experimental

Os experimentos com os camundongos foram realizados com duas diferentes concentrações do extrato aquoso de *L. albus* (0,5 mg/kg/dia e 1,5 mg/kg/dia), que equivalem, proporcionalmente, a 3 sementes/dia e a 9 sementes/dia para uso humano, devidamente adaptado para o peso dos camundongos. Os ensaios foram realizados separadamente, para cada uma das concentrações. Os animais foram subdivididos em oito diferentes grupos experimentais: um grupo controle negativo; um controle positivo e os seis diferentes grupos tratados com extrato aquoso de *L. albus* (tratamento sub-crônico, tratamento crônico, pré-tratamento, tratamento simultâneo, pós-tratamento e tratamento contínuo). Para cada um dos diferentes ensaios e concentrações, foram expostos cinco animais. Os animais foram submetidos ao tratamento por 12 semanas seguido de períodos de recuperação de até 72 horas, conforme protocolo sugerido por Mauro et al. (2008), e descrito no item 2.2.2.1.

2.2.2.1. Grupos Controles

2.2.2.1.1. Grupo de Tratamento Controle Negativo

Neste grupo, os animais receberam, durante as primeiras quatro semanas de experimentação, 0,1ml/10g de peso corpóreo (p.c) de água mineral. Após essas quatro semanas, os animais receberam quatro doses de solução de EDTA (0,37 mg/ml), sendo 0,1ml/10g p.c por semana (para provocar o mesmo estresse dos animais que receberam o agente indutor de mutagenicidade - DMH), e nas últimas quatro semanas receberam, diariamente água mineral. Por todo o período experimental, os animais foram tratados com água mineral e ração Nuvital® *ad libitum*. Completado as 12 semanas e as 72 horas de recuperação, foi coletado o sangue periférico para análise bioquímica da glicemia e colesterol total, LDL, HDL e triglicérides. Após realização da eutanásia por deslocamento cervical, foi coletada a medula óssea do fêmur dos animais, para a realização do ensaio do micronúcleo (MN). Por meio deste teste, foram avaliados potenciais efeitos genotóxicos, citotóxicos, mutagênicos, antigenotóxicos e antimutagênicos. Além da medula óssea do fêmur, também foram coletados e pesados todos os órgãos dos indivíduos experimentados que foram

observados macroscopicamente, para avaliação de possíveis alterações da coloração e da possível presença de tumores. Os órgãos foram devidamente armazenados.

2.2.2.1.2. Grupo de Tratamento Controle Positivo

Neste tratamento, os animais receberam, durante as quatro primeiras semanas, apenas, água mineral. Nas quatro semanas seguintes, receberam quatro doses de DMH, sendo administrada uma dose por semana, na concentração de 20 mg/kg. Nos demais dias deste período foi administrado água mineral, até completar 12 semanas de tratamento e 72 horas de recuperação. A alimentação, eutanásia e as coletas ocorreram conforme descrito no item 2.2.2.1.1.

2.2.2.2. Grupo de Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Mutagenicidade

2.2.2.2.1. Tratamento sub-crônico

Neste tratamento, os animais receberam água mineral nas quatro primeiras semanas, extrato de *L. albus* + EDTA nas quatro semanas subsequentes e água mineral nas quatro últimas semanas. Após 12 semanas de tratamento e 72 horas de recuperação, os animais foram eutanasiados. As coletas de todo material de investigação foi feita como descrito no item 2.2.2.1.1.

2.2.2.2.2. Tratamento crônico

Os animais receberam os extratos de *L. albus*, diariamente, durante todo período experimental, porém da 5ª a 8ª semanas receberam também EDTA. Após as 12 semanas de tratamento e 72 horas de recuperação, os animais foram eutanasiados. As coletas ocorreram como descritas no item 2.2.2.1.1.

2.2.2.3. Grupo de avaliação da antigenotoxicidade, antimutagenicidade e anticarcinogenicidade do *L. albus*

2.2.2.3.1. Grupo de Pré- Tratamento

Neste tratamento, os animais receberam, durante as quatro primeiras semanas, extrato de *L. albus*, nas quatro semanas seguintes, água mais quatro doses de DMH, sendo uma dose por semana e nas últimas quatro semanas água mineral. A alimentação, eutanásia e coletas ocorreram conforme descrito no item 2.2.2.1.1.

2.2.2.3.2. Grupo de Tratamento Simultâneo

O tratamento simultâneo foi realizado com os animais recebendo, nas quatro primeiras semanas, água mineral, nas quatro semanas seguintes o extratos de *L. albus*, juntamente com quatro doses de DMH (uma dose por semana) e nas últimas quatro semanas água mineral. Após este período, houve a eutanásia e a coletas como descrito no item 2.2.2.1.1.

2.2.2.3.3. Grupo de Pós-tratamento

Neste tratamento, os animais receberam água mineral nas quatro primeiras semanas, água mineral e quatro doses de DMH nas quatro semanas seguintes, (uma dose por semana) e extrato de *L. albus* nas quatro últimas semanas do experimento. Após este período, houve a eutanásia e as coletas, conforme descrito no item 2.2.2.1.1.

2.2.2.3.4. Grupo de Tratamento Contínuo

Neste tratamento, os animais receberam, durante todo tempo extrato de *L. albus*. Da 5ª a 8ª semanas receberam também quatro doses de DMH, sendo uma dose por semana. A eutanásia e as coletas ocorreram como descritas no item 2.2.2.1.1.

As administrações do DMH e do EDTA foram feitas por via intraperitoneal (i.p). A água e as concentrações dos extratos de *L. albus* foram administradas via gavagem. Todos os grupos receberam água e ração *ad libitum*, durante todo período experimental.

2.2.3. Bioensaios

2.2.3.1. Avaliação da citotoxicidade, genotoxicidade, antigenotoxicidade, mutagenicidade e antimutagenicidade pelo ensaio de micronúcleo em medula óssea.

Após a eutanásia dos animais, foram retirados, com o auxílio de uma tesoura, os fêmures de cada animal. Para extração da medula óssea foram realizadas secções nas epífises dos ossos, para que o canal medular ficasse exposto. Com auxílio de uma seringa, foi introduzida uma agulha no canal medular, para ser injetado 3 mL de soro fetal bovino, sendo repetida esta operação até que toda medula fosse retirada. O soro com a medula óssea obtida foram acondicionados em tubos falcon®. Para o procedimento do ensaio, os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 1000rpm. O sobrenadante foi descartado e a suspensão obtida foi homogeneizada, para então serem confeccionadas as distensões medulares. As lâminas com as extensões medulares foram fixadas em álcool 70% por 5 minutos, secas e coradas, sequencialmente pela solução de Wright por 3 minutos, solução de Wright e tampão fosfato pH 7,4 (1:1) por 1 minuto e em uma mistura de tampão fosfato, água destilada e corante

Giernsa (10:10:1) por 10 minutos. Na sequência, as lâminas foram lavadas em água corrente, para a retirada do excesso de corante, e depois secas por um período mínimo de 7 dias, antes de serem montadas em Entelan[®]. Esta coloração é indicada para a análise diferencial dos Eritrócitos Policromáticos (PCEs) e Eritrócitos Normocromáticos (NCEs) (RIBEIRO et al., 2003). Foram confeccionadas, para cada animal experimentado, 2 lâminas, que foram observadas (teste-cego) em microscópio de luz (objetiva de 100x). Foram contados 2000 PCEs por animal, anotando-se a frequência de NCEs e MNs, tanto para PCEs quanto NCEs.

Para a análise de toxicidade, foram contados 2000 PCEs e observada a frequência de NCEs.

2.2.4. ANÁLISES DOS RESULTADOS

2.2.4.1. Citotoxicidade

O cálculo de citotoxicidade do *L. albus*, foi feita pela porcentagem de PCEs, encontrada no ensaio de MN de medula óssea, segundo a fórmula:

$$\% \text{ de PCEs} = [\text{PCEs} / (\text{PCEs} + \text{NCEs})] \times 100$$

2.2.4.2. Análise do MN

2.2.4.2.1. Mutagenicidade

Frequência de MNPCEs e de MNNCEs

Para o cálculo da frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MNPCEs), e em eritrócitos normocromáticos (MNNCEs) foram utilizadas as seguintes fórmulas:

$$\text{Freq. de MNPCEs} = (\text{N}^\circ \text{ de MN} / \text{N}^\circ \text{ de PCEs}) \times 100$$

$$\text{Freq. de MNNCEs} = (\text{N}^\circ \text{ de MN} / \text{N}^\circ \text{ de NCEs}) \times 100$$

2.2.4.3. Antimutagenicidade

2.2.4.3.1. Redução de danos MN

A porcentagem de redução dos danos em eritrócitos, ocasionadas pelo efeito dos extratos de *L.albus*, avaliada pelo teste de MN, foi calculada pela fórmula:

$$\% \text{ RD} = [(\text{N}^\circ \text{ MN C+}) - (\text{N}^\circ \text{ MN grupo trat.})] / [(\text{N}^\circ \text{ MN C+}) - (\text{N}^\circ \text{ MN C-})] \times 100$$

2.2.4.4. Análises estatísticas

As análises estatísticas para análise de MN foram realizadas com o software BioEstat 5.0[®]. As variações entre os grupos e as doses foram realizadas por análise de variância ANOVA. Quando houve diferença estatística, foi utilizado o teste de comparação múltipla de Tukey, considerando valor de $p < 0.05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Avaliação do potencial genotóxico e mutagênico do extrato aquoso de *L. albus* em camundongos *Mus musculus*

Como podem ser observados na tabela 1, os resultados referentes ao teste de micronúcleo em medula óssea estão representados em número de PCEs, MNPCEs, NCEs e MNNCEs e frequência de MN, que variam de 0.07% a 0.23% para os MNPCEs e de 0.05% a 0.27% para MNNCEs. Os resultados obtidos para análise de genotoxicidade e mutagenicidade, demonstram que houve indução estatisticamente significativa apenas de MNPCEs, para o grupo de tratamento sub-crônico, na concentração de 1.5 mg/kg/dia. Sendo assim, podemos inferir que o extrato aquoso de *L.albus*, nesta concentração e neste período de exposição, apresentou efeito genotóxico e mutagênico para os camundongos.

O teste de micronúcleo é um teste *in vivo* que faz parte de uma bateria de testes recomendado por agências fiscalizadoras de todo o mundo para avaliar a segurança de produtos químicos e naturais. Os micronúcleos são massas de cromatina que aparecem em eritrócitos jovens, decorrentes de fragmentos acêntricos ou de cromossomos que foram perdidos, durante o processo de segregação cromossômica dos eventos de divisão celular (SALAMONE; HEDDLE, 1983; OUANES, et al., 2003).

O teste de MN, realizado com a medula óssea de mamíferos, é um método utilizado para avaliar a capacidade de substâncias químicas induzirem danos cromossômicos em células de medula óssea que estão em estágio de divisão (FENECH, 2005). Desta forma, nossos resultados demonstraram que a frequência de micronúcleos de células de medula óssea de camundongos expostos à ação do agente genotóxico DMH, foi significativamente maior, quando comparados ao grupo controle negativo. Porém, quando os grupos tratados com o *L. albus* foram comparados com ao controle positivo, a frequência de micronúcleos foi semelhante, sendo estatisticamente significativo somente para o grupo de tratamento sub-crônico, tratado com a concentração de 1.5 mg/kg/dia. Assim, podemos inferir que, para este

tempo de exposição e para esta concentração, o extrato *L. albus* foi capaz de causar alterações no DNA, caracterizando-se como um agente potencialmente genotóxico.

Mesmo considerando que alguns extratos vegetais contenham metabólitos secundários genotóxicos, os mecanismos envolvidos nesta ação ainda não estão totalmente esclarecidos (FAGUNDES et al., 2005).

Tabela 1: Avaliação da mutagenicidade e genotoxicidade do *L. albus* em eritrócitos de medula óssea de camundongo *Mus musculus*.

Grupos	Nº de PCEs	Nº DE MNPCEs	Frequência de MNPCEs	Nº de NCEs	Nº de MNNCEs	Frequência de MNNCEs
Controle Negativo (CN)	10.000	8	0.08%	9.905	5	0.05%
Controle Positivo (CP)	8.000	16	0.20%	6.427	17	0.26%
Trat.Sub-Crônico-0.5mg/kg/dia	10.000	7	0.07%	8.328	15	0.18%
Trat.Sub-Crônico-1.5mg/kg/dia	10.000	19*	0.19%	10.001	15	0.15%
Trat.Crônico-0.5mg/kg/dia	10.000	13	0.13%	9.203	7	0.07%
Trat.Crônico-1.5mg/kg/dia	10.000	16	0.16%	7.139	10	0.14%

* Estatisticamente significativo (ANOVA e Tukey p< 0.05)

3.2. Avaliação do potencial citotóxico do extrato aquoso de *L. albus* em camundongos *Mus musculus*

Na avaliação da citotoxicidade de *L. albus*, os valores de PCEs não apresentaram resultados significativos, como pode ser observado na tabela 2. Segundo Ribeiro, et al., (2003), o percentual de PCEs normalmente varia de 50 a 60%, podendo ser considerado citotóxico quando apresentarem uma diminuição numérica de PCEs em relação ao existido pelo CN. Desta forma, pela análise do índice de citotoxicidade, observamos que a administração do extrato de *L. albus*, nas concentrações e no período testado, não induziu efeito citotóxico, visto que a porcentagem de PCEs não foi significativa, quando comparados aos valores encontrados para o grupo CN.

Tabela 2: Avaliação da citotoxicidade do *L. albus* em eritrócitos da medula óssea de camundongos

Grupos	Total de PCEs	Total de NCEs	% De PCEs
Controle Negativo (CN)	10.000	9.905	50%
Controle Positivo (CP)	8.000	6.427	55%
Trat.Sub-Crônico-0.5mg/kg/dia	10.000	8.328	55%
Trat.Sub-Crônico-1.5mg/kg/dia	10.000	10.001	50%
Trat.Crônico-0.5mg/kg/dia	10.000	9.203	52%
Trat.Crônico-1.5mg/kg/dia	10.000	7.139	58%

3.3. Avaliação do potencial antigenotóxico e antimutagênico do extrato aquoso de *L. albus* em camundongos *Mus musculus*

O teste do micronúcleo em medula óssea de roedores visa detectar e quantificar a ação mutagênica e/ou anti-mutagênica de agentes químicos (CHOY, 2001). Esse ensaio apresenta algumas vantagens em relação aos outros, dentre elas uma maior sensibilidade, um menor custo e maior confiabilidade, além de aplicação praticamente em qualquer população de células que esteja em constante divisão. A medula óssea de mamíferos se caracteriza em um dos tecidos mais adequados para a aplicação deste teste, visto que suas células levam de 22 a 24 horas para completar um ciclo de divisão (HEDDLE, 1973; LEITE et al., 2006).

Estão representados na tabela 3 os resultados referentes ao teste de micronúcleo em medula óssea, usados para a avaliação do potencial antigenotóxico e antimutagênico. Onde dados estão representados em porcentagem de redução de danos.

O grupo de pré-tratamento, concentração de 1.5 mg/kg/dia, apresentou uma percentual de redução de danos de 87.5%, o tratamento simultâneo, na concentração de 0.5 mg/kg/dia de 112%, e o de tratamento contínuo na concentração de 0.5 mg/kg/dia de 100%. Para estes grupos, o resultado da taxa de redução de danos foi maior, porém os grupos de pré-tratamento, concentração de 0.5 mg/kg/dia (37,5%), e os tratamento simultâneo (25%) e o pós-tratamento (37,5%), ambos na concentração de 1.5 mg/kg/dia, também apresentaram redução de danos, em taxas menores. Por estes resultados, podemos inferir que nestas condições de exposição, os extratos de *L. albus* foram capazes de reduzir a frequência de micronúcleos em medula óssea de camundongos. Já o grupo de tratamento contínuo, concentração de 1.5 mg/kg/dia apresentou um percentual de redução igual a 0% e o grupo de pós-tratamento, concentração de 0.5 mg/kg/dia, apresentou redução no percentual de danos negativa (- 25%).

Existem vários estudos que evidenciam relações entre substâncias mutagênicas com potencial carcinogênico. Essa correlação está associada, na maioria das vezes de 50 a 90% as características químicas do agente testado. Baseado nos resultados apresentados, sugerimos que a ação dos extratos de *L. albus*, nas condições testadas, consegue desempenhar uma ação desmutagênica e bioantimutagênica, pois este extrato foi capaz de inativar os efeitos da DMH, reduzindo drasticamente a taxa de indução de MN em eritrócitos da medula óssea.

Pelos nossos resultados podemos inferir que o efeito de *L. albus*, quando administrados antes de alguma agressão, como no pré-tratamento realizado neste trabalho, é dose dependente, ou seja, para esta exposição, quanto maior a concentração testada, maior foi seu efeito antimutagênico. Contudo, para os tratamentos simultâneo e contínuo, ocorreu o inverso, onde a concentração menor foi a mais efetiva.

Os resultados positivos para a redução de danos dos grupos de pré-tratamento e tratamento simultâneo afirmam que os extratos de *L. albus* pode ter adsorvido a DMH, ainda na luz intestinal ou no meio intracelular e, desta forma ter agido por meio da desmutagênese, provavelmente devido a sua ação moduladora sobre o sistema de reparo (DE FLORA, 1998; OLIVEIRA et al. 2006). Para o grupo de tratamento contínuo, o extrato de *L. albus* foi eficaz em manter a fisiologia dos eritrócitos dentro da normalidade, protegendo o DNA de danos, durante o tempo experimental. Pelo grupo de pós-tratamento, podemos inferir que o extrato de *L. albus* conseguiu modular as enzimas celulares pelo processo de bioantimutagênese (DE FLORA, 1998; OLIVEIRA et al. 2006).

Tabela 3: Avaliação da antigenotoxicidade e antimutagenicidade representada em % de redução de danos (%RD)

Grupos	Nº DE MNPCEs	% RD
Controle Negativo (CN)	8	-
Controle Positivo (CP)	16	-
Pré-Tratamento-0.5mg/kg/dia	13	37,5%
Pré-Tratamento-1.5mg/kg/dia	9	87,5%
Tratamento Simultâneo-0.5mg/kg/dia	7	112%
Tratamento Simultâneo-1.5mg/kg/dia	14	25%
Pós-Tratamento-0.5mg/kg/dia	18	-25%
Pós-Tratamento-1.5mg/kg/dia	19	-37,5%
Tratamento Contínuo-0.5mg/kg/dia	8	100%
Tratamento Contínuo-1.5mg/kg/dia	16	0%

3.4. Avaliação macroscópica dos órgãos dos animais experimentados

Na tabela 4 estão representados os resultados das avaliações macroscópicas de indução de tumorização pelos extratos de *L. albus* sobre camundongos da espécie *Mus musculus*. Foi observado que o tratamento sub-crônico, para ambas as concentrações testadas, induziu tumores no fígado, a concentração maior deste mesmo tratamento também induziu tumor nos rins dos camundongos, também foi possível observar a formação de tumores no pulmão do grupo de pré-tratamento, nos rins do grupo de tratamento simultâneo e no fígado do grupo de pós-tratamento.

Em estudo realizado previamente pelo nosso grupo, foi determinado e quantificado nos extratos de *L. albus* o alcaloide lupanina, que é um alcaloide tóxico e carcinogênico para o fígado e rins, o que pode explicar os resultados encontrados nesta avaliação. Porém, se levarmos em conta que no grupo de tratamento contínuo com *L. albus* os animais não apresentaram qualquer indução tumorigênica, podemos sugerir que para estes tratamentos pode ter ocorrido uma modulação de reparo de processos carcinogênicos, possivelmente por ação contínua dos extratos sob os animais. Não podemos ainda descartar o fato de *L. albus* ser uma planta que apresenta compostos do metabolismo primário e secundário de várias famílias químicas, que podem apresentar alguma toxicidade a sistemas biológicos e, assim, promover um comprometimento, inclusive citotóxicos, genotóxicos, mutagênicos e carcinogênicos ao organismo exposto, levando em conta que o extrato é bruto assim como utilizado pela medicina popular e suas substâncias podem interagir entre si, ocasionando um efeito sinérgico.

Os nossos resultados, para processo de tumorização, talvez possam, talvez, ser explicados pelo fato da DMH (eficiente carcinógeno de cólon) ter sofrido metabolização pelo fígado, e seus metabólitos passados para a corrente sanguínea, sendo então absorvidos no intestino. A ação sinérgica da DMH e lupanina, associados ainda a outros possíveis compostos presentes no extrato de *L. albus*, podem ainda ter induzido a formação de tumores nestes órgãos. Outra possibilidade da indução de tumor, pode ser devido a um possível efeito potencializador da DMH sobre a lupanina. Porém, esses efeitos só poderão ser comprovados com estudos adicionais, específicos para este tipo de análise.

Tabela 4: Relação entre as concentrações usadas nos tratamentos realizados com *L. albus* e os órgãos afetados por tumorigênese.

Grupos	Tumores
Controle Negativo	-
Controle Positivo	-
Trat. sub-crônico- 0.5mg/kg/dia	Fígado
Trat. sub-crônico- 1.5mg/kg/dia	Fígado/Rins
Trat. Crônico- 0.5mg/kg/dia	-
Trat. Crônico- 1.5mg/kg/dia	-
Pré-Tratamento-0.5mg/kg/dia	Pulmão
Pré-Tratamento-1.5mg/kg/dia	-
Tratamento Simultâneo-0.5mg/kg/dia	-
Tratamento Simultâneo-1.5mg/kg/dia	Rins
Pós-Tratamento-0.5mg/kg/dia	Fígado
Pós-Tratamento-1.5mg/kg/dia	-
Tratamento Continuo-0.5mg/kg/dia	-
Tratamento Continuo-1.5mg/kg/dia	-

4. CONCLUSÃO

Os resultados encontrados neste trabalho evidenciaram que o extrato de *L. albus* demonstrou ser genotóxico e mutagênico, quando em uso crônico na concentração de 1.5 mg/kg/dia (equivalente a 9 sementes ao dia/homem). Por estes resultados, podemos considerar que sementes de *L. albus* devam ser consumidas com cautela, pois se ingeridas em excesso, por um período de tempo prolongado, podem induzir efeitos genotóxicos e mutagênicos, eventos estes que podem levar a processos carcinogênicos.

Já para a antigenotoxicidade e antimutagenicidade, os extratos de *L. albus* mostraram um efeito benéfico, pois agiu protegendo o organismo contra as lesões promovidas pela 1,2-

dimetilhidrazina (DMH). Essa prevenção se deu pela diminuição das lesões (redução de 100% o danos induzidos), ocasionados pela DMH, quando o extrato for administrado continuamente, na concentração de 0.5mg/kg/dia.

5. AGRADECIMENTOS

Os autores agradecem à Prof^ª. Dr^ª. Elaine Cristina Mathias da Silva Zacarin, do departamento de Biologia Estrutural e Funcional da UFSCAR de Sorocaba e a Dr^ª. Patrícia Rosa do departamento de Biologia Celular e Molecular, Instituto de Biociências da UNESP de Rio Claro, pela revisão do texto, quando este foi apresentado no exame de qualificação da aluna.

6. REFERÊNCIAS

AGRO PASTO SEMEAR, Paraná. **Tremoço**. Disponível em: http://www.semear.com.br/pg_3_13.htm Acesso em: 07/03/2013, Acesso em Março de 2013.

AMES, B. N., Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v.221, n.4617, pp.1256-1264, 1983.

ANDREASSI, M. G.; BOTTO, N.; COLOMBO, M. G.; BIAGINI, A.; CLERICO, A. Genetic instability and atherosclerosis: can somatic mutations account for the development of cardiovascular diseases., **Environ. Mol. Mutagen**, v.35, pp.265-269, 2000.

ARUOMA, O. I., Methodological considerations for characterizing potential antioxidante actions of bioactive components in plant foods, v.523, n.24, pp.9-20. **Mutation Research**, 2003.

BARRAI, I.; BARALE, R.; SCAPOLI, C.; AMBROSINO, P.; BERETTA, M.; SBRANA, C.; MICHELETTI, R.; LOPRIENO, N. The analysis of the joint effect of substances on reversion systems and the assessment of antimutagenicity. **Mutation Research**, v. 267, pp. 173-182, 1992.

BJELDANES, L. F.; CHANG, G. W. Mutagenic activity of quercetin and related compounds. **Science**, v.197, pp.577-578, 1977.

BUTTERWORTH, B.E. A classification framework and practical guidance for establishing a mode of action for chemical carcinogens. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.45, pp.9-23, 2006.

CHEN, H.-Y.; YEN, G. C., Possible mechanisms of antimutagens by various teas as judged by their effects on mutagenesis by 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline and benzo[a]pyrene, **Mutat. Research.**, v.393, pp.115-122, 1997.

CHOY, W. N., Regulatory genetic toxicology tests. **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment.**, pp. 93-113, 2001.

Comissão de Ensino do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Manual para técnica em bioterismo; 1996. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br>. Acesso em Fevereiro de 2013.

DE FLORA, S., DNA adducts in chronic degenerative diseases. Pathogenic relevance and implications in preventive medicine. **Mutation. Research.**, n. 366, pp. 197-238, 1996.

DE FLORA, S., Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Research.**, v.402, pp. 151-158, 1998.

EVARD, S.; FALKENRODT, A.; PARK, A.; TASSETI, V. MUTTER, D.; MARESCAUX, J. Influence of CO₂ pneumoperitoneum on systemic and peritoneal cell-mediated immunity. **World Journal Surgery**, v. 21, n.4, pp. 353-6, 1997.

FAGUNDES, F. A.; OLIVEIRA, L. B.; CUNHA, L. C.; VALADARES, M. C., *Annona coriacea* induz efeito genotóxico em camundongos., **Revista Eletrônica de Farmácia.**, v.2, n.1, pp. 24-29, 2005.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEIL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research**, v. 339, pp. 37-59, 1995.

FENECH, M. In vitro micronucleus technique to predict chemosensitivity. **Methods Mol Med.** n.111, pp.3-32, 2005.

FENECH, M., The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mut. Research**, v.392, pp. 11-18, 1997.

FERGUSON, L. R., Antimutagens as cancer chemopreventive agents in the diet. **Mutation Research**, n.307, pp. 395-410, 1994.

GOGGELMANN, W.; SCHIMMER, O., Mutagenic activity of phytotherapeutical Drugs. **Progress in Clinical Biological Research**, v.206, pp. 63-72, 1986.

HARTMAN, P.E.; SHANKEL, D.M. Antimutagens and anticarcinogens: A survey of putative interceptor molecules. **Envir. and Molec. Mutagenesis**, v.15, pp.45-182, 1990.

HEDDLE, J. A., A rapid in vitro test for chromosomal damage., **Mutat. Res.** n.18, pp. 187-190, 1973.

JIMENÉZ, M. R.; SANCHÉZ, J. C.; MOHAMED, A. M.; MUÑOSSERRANO, A.M.; MORAGA, A., Genotoxicity and anti-genotoxicity of some traditional medicinal herbs. **Mut.Res/Gen. Toxicol. Env. Mut.**, v.585, pP.147-155, 2005.

KADA, T.; SHIMOI, K., Desmutgens and bio-antimutagens: Their modes of action. **Bio Essays**, v.7, pp.113-115, 1987.

KAREKAR, V.; JOSHI, S.; SHINDE, S. L., Antimutagenic profile of three antioxidants in the Ames assay and the *Drosophila* wing spot test. **Mutation Research**, v.468, pp. 183-194, 2000.

KONSTANTOUPOULOU, I.; VASSILOPOULOV, L.; MAVIAGANITSIPIDO, U.; SCOURAS, Z.G., Inseticidal effects of essential oils. A study of the effects of essential oils extracted from eleven greek aromatic plants on *Drosophila auraria*. **Experientia**, n.48, pp. 616-619, 1992.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M., In vivo rodent micronucleus assay, protocol, conduct and data interpretation. **Mut. Research**, v.455 pp.155-166, 2000.

LEITE, K. R.; ANDRADE, L. S.; SENA, J. S.; VILLAR, J. B.; CHEN, L.C., Avaliação da atividade Mutagênica e Genotóxica de *Ginkgo biloba* L. pelo teste do micronúcleo em camundongos, **Rev. Biol. Neotrop.** n.3, v.2, pp.157-162, 2006.

LOHMAN, P. H. M.; GENTILE J. M.; GENTILE, G.; FERGUNSON, L. R., Antimutagenesis/anticarcinogenesis 2001: screening, methods and biomarkers. **Mutat Res.** n.496, pp.1-230, 2001.

MARQUES, R. C. P.; MEDEIROS, S. R. B.; DIAS, C. S.; FILHO, J. M. B.; LIMA, L. F. A. Evaluation of the mutagenic potential of yangambin and of the hydroalcoholic extract of *Ocotea duckei* by the Ames Test. **Mutation Research**, v.536, pp.117-120, 2003.

MATEUCA. R.; LOMBAERT, N.; AKA, P. V., **Chromosomal changes, induction, detection methods and applicability in human biomonitoring Biochimie.**, v.88, pp.515-531, 2006.

MAURO, M. O., **Avaliação dos efeitos antigenotóxicos, antimutagênicos e anticarcinogênicos do frutooligosacaridio inulina in vivo.** Trabalho de Conclusão de Curso. Unifil – Londrina – Paraná. 2008.

OLIVEIRA, R. J.; RIBEIRO, L.; SILVA, A.; MAURO, R.; MANTOVANI, M., Evaluation of antimutagenic activity and mechanisms of action of b-glucan from barley, in CHO-K1 and HTC cell lines using the micronucleus test. **Toxicology in vitro**, Oxford, v. 20, pp. 1225-1233, 2006.

OUANES, Z.; ABID, S.; AYED, I.; ANANE, R.; MOBIO, T.; CREPPY, E. E.; BACHA, H. Induction of micronuclei by Zearalenone in Vero monkey kidney cells and in bone marrow cells of mice: protective effect of Vitamin E. **Mutat. Res.** v.538, pp.63-70, 2003.

PECAUT, M. J.; SMITH, A. L.; JONES, T. A.; GRIDLEY, D. S. Modification of immunologic and hematologic variables by method of CO₂ euthanasia. **Comparative Medicine**, v.50, n.6, pp.595-602, 2000.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M .F.; MARQUES, E. K., **Mutagênese ambiental**. Canoas-RS: Ed. ULBRA, 2003.

ROSS, C. A.; MARGOLIS, R. L., Neurogenetics: insights into degenerative diseases and approaches to schizophrenia. **Clin Neurosc Res**; v.5, pp.3-14, 2005.

SALDAÑA, M. D. A.; MAZZAFERA, P.; MOHAMED, R. S., Uso de fluidos supercríticos para obtenção de alcalóides de plantas naturais. **Bol. SBCTA.**, v.32, n.1, pp.80-88, 1998.

SALAMONE, M. F.; HEDDLE, J. A., The bone marrow micronucleus assay: rationale for a revised protocol. **Chem Mutagens**, v.8, pp.111-149, 1983.

SILVA, M. S., **Avaliação química, biológica e nutricional da farinha de tremço branco doce (*Lupinus albus* var. *multolupa*)**. Piracicaba, 103p. Dissertação Mestrado- ESALQ – Universidade de São Paulo, 1991.

SILVA, R. C. **Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica de *Duguetia furfuracea* em bactérias e camundongos**. Dissertação de mestrado – Universidade Federal de Goiás, Curso de pós-graduação em Biologia, Goiás, 2008.

SIMIC, D.; VUKOVIC-GACIC, B.; KNECEVIC-VUKCEVIC, J., Detection of natural bioantimutagens and their mechanisms of action with bacterial assay-sistem. **Mutation Research** , v.402, pp.52-57, 1998.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; da SILVA FILHO, A. A.; de SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A . E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIN, Y. M. Effect of Brazilian Green propolis on the production of oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology.**, v.94, pp.59-65, 2004.

TAVARES W., **Introdução ao estudo dos antimicrobianos. In: Manual de antibióticos e quimioterápicos anti-infecciosos.** Ed. Rio de Janeiro: Atheneu, pp. 3-13, 1996.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C., Synadenium umbellatum: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Rev. Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, pp.631-638, 2007.

WATERS, M. D., STACK, H. F., JACKSON, M. A., BROCKMAN, H. E., DE FLORA S., Activity profiles of antimutagens: in vitro and in vivo data. **Mutation Research**, v.350, n.1, pp.109-129, 1996.

WEISBURGER, E .K., Natural carcinogenic products. **Env. Science & Technology.**, v.13, pp.278-281, 1979.

YANG, C. S.; CHUNG, J. Y; YANG, G. Y.; LI, C.; MENG, X. F.; LEE, M. J. Mechanisms of inhibition of carcinogenesis by tea. **Biofactors.**, v.13, pp.73-79, 2000.

5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados obtidos nos levam a concluir que são necessários mais estudos para podermos afirmar, seguramente, que os extratos de *L. albus* apresentam efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos. Verificamos, pelas análises realizadas, que os resultados pareciam promissores, quanto à ação antimutagênica e anticarcinogênica deste extrato vegetal. Porém, quando analisamos macroscopicamente os órgãos dos animais expostos, notamos a presença de tumores que poderiam, inclusive, restringir o seu uso na medicina popular.

Os dados obtidos nestes trabalhos nos sugere uma pesquisa mais detalhada, principalmente sobre todos os constituintes químicos presentes nos extratos de sementes de *L. albus*, uma vez que só foram realizadas técnicas para extração de alcaloides e ácidos graxos, sendo ainda essenciais pesquisas complementares para um detalhamento de todos os componentes com atividades biológicas que possam estar presentes nesses extratos. Também devem ser testadas outras concentrações dos extratos, além de isolados das suas mais importantes substâncias, para verificação da relação de cada uma com indução de tumores.

Alertamos que as sementes de tremoço devem ser consumidas com cautela, pois quando consumidas em excesso podem provocar efeitos genotóxicos e mutagênicos. Alertamos ainda que as substâncias desta planta podem aumentar a predisposição de tumorização, quando associadas a uma exposição do organismo a um agente mutagênico.

Porém, se conseguirmos identificar qual o agente causador desses efeitos adversos indesejáveis, o *L. albus* pode ser um material vegetal promissor como quimiopreventivo de câncer de cólon, ou como adjuvante nos tratamentos desta enfermidade.

6. CONCLUSÕES GERAIS

Pelos resultados obtidos nos ensaios realizados com as duas concentrações de *L. albus*, podemos concluir que:

- Os extratos utilizados neste trabalho, baseados na concentração usual da medicina popular e em análise cromatográfica, apresentaram o alcaloide lupanina, e os ácidos graxos palmítico, linoleico, oleico e esteárico.
- Quanto á análise dos níveis de glicemia, ao contrário dos resultados encontrados para isolados proteicos desta planta, foi possível observar indução de uma hiperglicemia, para todos os grupos tratados.
- Quanto aos níveis de colesterol, não foi possível observar efeitos significativos do extrato de *L. albus* sobre os organismos tratados.
- O extrato de *L. albus* apresentou potencial genotóxico e mutagênico pra o tratamento sub-crônico na concentração de 1.5 mg/kg/dia (que equivale ao consumo de 9 sementes/dia/homem).
- Os extratos de *L. albus* conseguiram reverter e/ou inibir a progressão das lesões pré-neoplásicas e, conseqüentemente, prevenir o desenvolvimento do câncer colorretal.
- Na contagem diferencial de leucócitos, foi possível observar uma resposta imunomoduladora das células sanguíneas, pelo aumento do nível de neutrófilos e monócitos, células estas responsáveis pela fagocitose envolvidas nos processos inflamatórios e auxiliares no combate dos processos tumorais.
- Os extratos de *L. albus* levaram também á processos de tumorização no rim, no fígado e no pulmão. Fato este que pode ser justificado pela presença do alcaloide lupanina.

7. REFERÊNCIAS GERAIS

AGRO PASTO SEMEAR, Paraná. **Tremoço**. Disponível em: http://www.semear.com.br/pg_3_13.htm Acesso em Março de 2013.

ALBERTS, B., **Fundamentos da Biologia Celular**., Ed. Artmed. Porto Alegre, 2002.

ALRAWI, S. J.; CHIFF, M.; CARROLL, R. E.; DAYTON, M.; GIBBS, J. F.; KULAVLAT, M.; TAN, D.; BERMAN, K.; STOLER, D. L.; ANDERSON, G. R., Aberrant crypt foci., **Anticancer Res.** vol. 26, n.1, pp.107-119, 2006.

AMERICAN DIABETS ASSOCIATION., diagnosis and classification of diabetes mellitus. **Diabetes care.** v.31, pp.55-60, 2008.

AMES, B.N. Dietary carcinogens and anticarcinogens. Oxygen radicals and degenerative diseases. **Science**, v. 221, nº 4617, p. 1256-1264, 1983.

ANDRADE, A.; PINTO, S. C.; OLIVEIRA, R. S.; **Animais de Laboratório: Criação e Experimentação**., Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2002.

ANDRADE, S. F.; CARDOSO, L. G.; BASTOS, J. K., Anti-inflammatory and antinociceptive activities of extract, fractions and populnoic acid from bark wood of *Austroplenckia populnea*. **Journal of Ethnopharmacoly**, v.109, n.3, pp.464-471, 2007.

ANIMAL WELFARE INSTITUTE. Basic care of experimental animals. New York: **Academic Press**, 78p, 1968.

ANVISA, Resolução-RDC nº 48, de 16 de março de 2004: dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. Disponível em: <http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/>, acesso em Fevereiro de 2013.

ARAÚJO, E. C. Use of medicinal plants by patients with cancer of public hospitals in João Pessoa (PB)., **Revista Espaço para a Saúde**., v.8, n.2, pp.44-52, 2007.

ARNOUS, A. H.; BEINNER, R. P. C.; SANTOS, A. S., Plantas medicinais de uso caseiro – conhecimento popular e interesse por cultivo comunitário. **Revista Espaço para a Saúde**, Londrina, v.6, n.2, 2005.

BANNER, B. F.; SAVAS, L.; BAKER, S.; WODA, B. A., Characterization of the inflammatory cell populations in normal colon and colonic carcinomas. **Virchows Archiv. B. Cell Pathol.**, v.64, pp.213- 220, 1993.

BENDAZZOLI, W. S., Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **Mundo Saúde**, 2000.

BIRD, R. P., Observation and quantification of aberrant crypts in the murine colon treated with a colon carcinogenesis: preliminary findings. **Cancer Lett.**, v. 37, n.2, pp. 147-251, 1987.

BOREK, C., The role of nutritional factors in cellular protection against DNA damage, altered gene expression and malignant transformation. **Mechanisms of DNA**, 1996.

BOTTING, J. H.; MORRISON, A. R., Animal research is vital to Medicine. **Scientific American**, pp. 67-69, 1997.

BOTSARIS, A. S.; MACHADO, P. V., Introdução à fitoterapia. Momento Terapêutico de Fitoterápicos, 1999.

BOYLE, P.; LANGMAN, J. S., ABC of colorectal cancer Epidemiology, **Clinical review**, v.321, pp.805-808, 2000.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J., **Genética**, Editora Guanabara Koogan. 6ª edição. Rio de Janeiro, 1991.

BRATMAN, S. **Guia prático de medicina alternativa: Uma avaliação realista dos métodos alternativos de cura**. Rio de Janeiro, 1998.

CALIXTO, J. B., Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents)., **Journal Med. Biol. Res.**, v.33, n. 2, pp. 79-189, 2000.

CAMPLEJOHN, R. S., Apoptosis, ageing and cancer susceptibility., **Journal. Cancer.**, v. 88, n. 4, pp. 487-490, 2003.

CASTRO, L. O.; CHENALLE, V. M. **Plantas medicinais, condimentares e aromáticas: descrição e cultivo**. Guaíba: Agropecuária, 1995.

CANADIAN COUNCIL ON ANIMAL CARE (CCAC). **Guide to the Care and Use of Experimental Animals**. Canadian Council on Animal Care, 1984.

CARDOSO, C. V. P., **Eutanásia**, Ed. Fio Cruz, pp. 275-279, 2002. Disponível em: <http://books.scielo.org/id/sfwjtj/pdf/andrade-9788575413869-32.pdf>, acesso em Março de 2013.

CARLI, A. P., **Correlação da atividade do proteassoma, expressão de CD44 e enzimas proteolíticas em extratos intestinais de camundongos tratados com 1,2-dimetilhidrazina e inibidores de bowman-birk.**, Tese de doutorado apresentada para ao programa de pós-graduação do núcleo de pesquisas em ciências biológicas da universidade Federal de Ouro Preto, 2011.

CHEN, G.; WHITE, P. A., The mutagenic hazards of aquatic sediments: a review. **Mutation research**, v.567, pp.151-225, 2004.

CHUNG, M. C.; CORDEIRO, C. H. G.; SACRAMENTO, L. V. S., Interação medicamentosas de fitoterápicos e fármacos: Hypericum perforatum e Piper methysticum. **Rev. Bras. Farmacog.** São Paulo, v.15, n.3, 2005.

COMISSÃO DE ENSINO DO COLÉGIO BRASILEIRO DE EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL (COBEA). Manual para técnica em bioterismo; 1996. Disponível em URL: <http://www.cobea.org.br>. Acesso Fevereiro de 2013.

COHEN, L. A., Dietary fiber and breast cancer. **Anticancer Res.**, v.19, pp. 3685-3688, 1999.

CORPET D. E.; PIERRE F., How good are rodent models of carcinogenesis in predicting efficacy in humans? A systematic review and meta-analysis of colon chemoprevention in rats, mice and men. **Journal Cancer.**, v.41, n.13, p.1911-1922, 2005.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R., Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutation Research.** V.521, n.1, pp.121-135, 2002.

DE FLORA, S., Mechanisms of inhibitors of mutagenesis and carcinogenesis. **Mutation Res.**, v.402, pp.151-158, 1998.

DE FLORA, S.; IZZOTTI, A.; D' AGOSTINI, F.; BALANSKY, R. M.; NOONAN, D.; ALBINI, A. Multiple points of intervention in the prevention of cancer and other mutation-related diseases. **Mutat. Res.**, v.480, pp.9-22, 2001.

DE FRONZO, Pathogenesis of type 2 diabetes mellitus. **Med. Clin. North Am.** v. 88, pp. 787- 885, 2004.

DE LUCCA, R.; R, ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T. **Manual para técnicos em bioterismo.** 2ª ed. São Paulo: COBEA, FINEP, 1996.

DE MARINI, D. M., Dietary interventions of human carcinogenesis. **Mutation Research**, v.400, pp.457-465, 1998.

DI GREGORIO, C.; LOSI, L.; FANTE, R.; MODICA, S.; GHIDON, M.; PEDRONI, M.; TAMASSIA, M. G.; GAFÀ, L.; PONZ, L. M.; RONCUCCI, L., Histology of aberrant crypt foci in the human colon. **Histopathology.**, v. 30, n. 4, pp.328-334, 1997.

DI STASI, L. C. **Plantas medicinais: arte e ciência – um guia de estudo multidisciplinar**. São Paulo: Ed. Universidade Estadual Paulista, 1996.

EDENHARDER, R.; VON PETERSDOFF, I.; RAUSCHER, V. Antimutagenic effects of flavonoids, chalcones and structurally related compounds on the activity of 2-amino-3-methylimidazo [4,5-f]quinoline (IQ) and other heterocyclic amine mutagens from cooked food. **Mutation Res**, v.287, n.2, pp.261-274, 1993.

ELDIN, S.; DUNFORD, A., **Fitoterapia na atenção primária a saúde**. São Paulo: Manoele, 2001.

FALKENBER, G. M.; BAUMGARTEN, D.; SIMIONATO, C. Screening of some Brazilian medicinal plants with the brine shrimp assay. **Acta Hort** v.502 pp.401-404, 1999.

FALUYI, M. A.; ZHOU, X. M.; ZHANG, F.; LEIBOVITCH, P.; MINGER, D. L.; SMITH. Seed quality of sweet white lupin (*Lupinus albus*) and management practice in eastern Canada., **J. Agron**, v.13, pp. 27–37, 2000.

FEARON, E. R.; VOGELSTEIN, B., A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, v.61, n.5, pp.759-767, 1990.

FELDHEIM, W., 1994., Fermentation of lupin fibre, p. 445. Proc. **VII Int. Lupin Conf.**, Évora, Portugal, J. M. Neves- Martins e M. L. Beirão da Costa, 1994.

FELDHEIM, W., Use of lupins as source of lipids and dietary fibre in human nutrition, Proc. **VI Int. Lupin Conf.**, 1990.Ternuco-Pucon, Chile. D. von Baer, pp.124. 1991.

FELDHEIM, W. The use of lupins in human nutrition. **IX Int. Lupin Conf.** New Zealand. 1999.

FELDHEIM, W.; WISKER, E., Use of lupin seed hull for enrichment with dietary fibre. Anon., **IV. Int. Lupin Conf.** Geraldton, Western Australia, pp. 298, 1986.

FEMIA A.P., Gene expression profile and genomic alterations in colonic tumors induced by 1,2-dimethylhydrazine (DMH) in rats. **BMC Cancer**. v. 10, pp. 194, 2010.

FERGUSON, L. R.; PHILPOTT, M.; KARUNASINGHE, N., Dietary cancer and prevention using antimutagens. **Toxicology**; n.198, pp.147–159, 2004.

FERREIRA, L. M.; HOCXHMAN, B.; BARBOSA, M. V. J., Modelos experimentais em pesquisa. **Acta Cir Brás**, v.20 pp.23-34, 2005.

FIOCRUZ (Fundação Oswaldo Cruz. Departamento de Biotérios/Bio-Manguinhos) **Manual para técnicos em animais de laboratório**. Rio de Janeiro: Setor de Multimeios/Fiocruz, 132p, 1993.

FOGLIO, M. A.; QUEIROGA, C. L.; SOUSA, I. M. O.; RODRIGUES, R. A. F., **Plantas Medicinais como Fonte de Recursos Terapêutico: Um Modelo Multidisciplinar**. Revista Multiciências. v.7, pp.1-8, 2006.

FRANÇA, I. S. X. Medicina popular: benefícios e malefícios das plantas medicinais. **Revista Brasileira de Enfermagem**, v.61, n.2, pp.201-208, 2008.

FUMAGALI, E.; GONÇALVES, R. A. C.; MACHADO, M. de F. P. S.; VIDOTI, G. J.; OLIVEIRA, A. B de, Produção de metabólitos secundários em cultura de células e tecidos de plantas: o exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e *Aspidosperma*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n.4 pp. 627-641, 2008.

GALLAPUDI, B.; MCFADDEN, L., Sample size for the estimation of polychromatic to normochromatic erythrocyte ratio in the bone marrow micronucleus test. **Mutat. Res**, n. 347, pp.97-99, 1995.

GARCIA-LOPEZ, P. M.; DE LA MORA, P. G.; WYSOCKA, W.; MAIZTEGUI, B.; ALZUGARAY, M. E., DEL ZOTTO, H. E BORELLI, M. I., Quinolizidine alkaloids from *Lupinus* species enhance insulin secretion. **J. Pharmacol.**, n. 504, pp. 139-142, 2004.

GILIOLI, R. **Avaliação do perfil sanitário de colônias de camundongos e de ratos em biotérios brasileiros: ocorrência de bactérias, parasitas e vírus murinos.** Tese de doutorado. Campinas: Universidade Estadual de Campinas, 2003.

GREENWALD, P.; CLIFFORD, C. K.; MILNER, J. A., Diet and cancer prevention. **J. Cancer.**, v.37, pp.948-965, 2001.

GRÜTER, A.; FRIEDERICH, U.; WÜRGLER, F. E., Antimutagenic effects of mushrooms. **Mutation Res.**, v.231, pp.243-249, 1990.

GUIDE FOR THE CARE AND USE OF LABORATORY ANIMALS, 1993. Disponível em: http://www.aaalac.org/accreditation/RefResources/CCAC_Experimental_Animals_Vol1.pdf. Acesso em Março de 2013.

GURIB-FAKIM, A., Medicinal plants: traditions of yesterday. **Molecular Aspect of Medicine**, n.27, pp.1-93, 2006.

HANADA, K.; HIRANO, H. Interaction of a 43 kDa receptor-like protein with a 4 kDa hormone-like peptide in soybean. **Biochem**, v.28, p.p.12105-12112, 2004.

HANAUSEK, M.; WALASZEK, Z.; SLAGA, T. J., Detoxifying Cancer Causing Agents to Prevent Cancer. **Integr Cancer Ther.** n.2, pp.139, 2003.

HEDDLE, N. M., KLAMA, L., MEYER, R., WALKER, I., BOSHKOV, L., ROBERTS, R., CHAMBERSS, PODLOSKY, L., O'HOSKI, P.; LEVINE, M., A randomized controlled trial comparing plasma removal with white cell reduction to prevent reactions to platelets. **Transfusion**, n.39, pp.231-238, 1999.

HEDRICH, H., The laboratory mouse. Disponível em <http://books.google.com.br/books?hl=ptBR&lr=&id=J4Ip20dvFEsC&oi=fnd&pg=PP2&dq=>

HEDRICH, +2004+the+laboratory+mouse&ots=OZAzY2WNwU&sig=Y98uFSjyet55GagtNc tCOAMjwDI. Acesso em março de 2013.

HILL, G. D., The composition and the nutritive value of lupin seed. **Nutr. Abst. Rev.** v.47, p.p. 511-529, 1977.

HOENSCH, H. P.; KIRCH, W., Potential role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia: a review of their mode of action and their clinical perspectives. **Int. J. Gastrointest. Cancer**, n.35, pp. 187-195, 2005.

HOFF J., Methods of blood collection in the mouse. **Lab Anim.**, n.29 v.10, pp. 47-53, 2000.

HUYGHE, C. White lupin (*Lupinus albus* L.) **Field Crops.**, v.53, pp. 147–160, 1997.

Instituto Nacional do Câncer (INCA), Estimativa 2012, <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/estimativa20122111.pdf>, Acesso em: Março de 2013.

JUCÁ, M.; BARROS, B. L. B.; NUNES, P.; MENEZES, H. L.; GOMES, E. G. A.; MATOS, D., Metaloproteinases 1 e 7 e câncer colorretal, *Rev. Bras. Colo-Proctol.*, v. 28, 2008.

JUNQUEIRA, L. C., CARNEIRO, J., *Histologia Básica*. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 2004.

JURY, H. H., ZACHAREWSKI, T. R. E HAMMOND, G. L. Interactions between human plasma sex hormone binding globulin and xenobiotic ligands. *J. Steroid Biochem. Mol. Biol*, v.75, pp.167-176, 2000.

KADA, T.; KANEKO, K.; MATSUZAKI, S.; MATSUZAKI, T.; HORA, Y., Detection and chemical identification of natural bio-antimutagens: A case of the green tea factor. *Mut. Res.* v.150, pp.127-132, 1978.

KAHATTAB, R. Y.; ARNTFIELD, S.; NIACHOTI, C. Nutricional quality of legume seeds as affected by some physical treatment, Part 1: Protein quality evalution., **Food science and technology**, v.42, pp.1107-1112, 2009.

KAMALEESWARI, M., TUVELAN, M., NALINI, N. Effects of dietary caraway (*Carum carvi L.*) on aberrant crypt foci development, fecal steroid, and intestinal alkaline phosphatase activities in 1,2- dimethylhydrazine- induced colon carcinogenesis. **Toxicol Appl Pharmacol.**, v.214, n.3, pp. 290-296, 2006.

KAY, R. M.; STRASBERG, S. M., Origin, chemistry, physiological effects and clinical importance of dietary fibre., **Clin Inest Med**; n.1, pp.9-24, 1978.

KING, H.; AUBERT, R. E.; HERMAN, W. H. Global burden of diabetes, 1995-2025: prevalence, numerical estimates, and projections. **Diabetes Care.**, v.21, pp.1414-1431, 1998.

KOHLMEIER, N.; SIMONSEN, N.; MOTTUS, K., Dietary modifiers of carcinogenesis., **Health Perspectives**, n.103, pp.177-184, 1995.

KÖRPER, S.; WIN, M.; FINK, R. A., Differencial effects of alkaloids on sodium currents of isolated single skeletal muscles fibres. **FEBS Lett.**, v.436, pp.251-255, 1998.

KRISHNA, G.; HAYASHI, M. In vivo rodent micronucleus assay, protocol, conduct and data interpretation. **Mut. Research**, v.455 pp.155-166, 2000.

KUMAR, P.; SWEERAMA, Y. N.; GOWDA, L. R., Formation of bowman-birk inhibitors during the germination of horsegram (*Dolichosbiflorus*). *Phytochemistry*, v. 60, pp.581-588, 2002.

LAMPART-SZCZAPA, E. Chemical and funcional properties of food proteins, Ed. Boca roton, **CRC Press.**, 2001.

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

LUP INGREDIENTS. **A short visit in an ancestral culture**. Disponível em: http://www.lupin.fr/V3uk/le_lupin_ang.htm Acesso em: Março de 2013.

MACIEL, M. A. M.; PINTO, A. C.; VEIGA JUNIOR, V. F. Plantas medicinais: cura segura?., **Quím. Nova**. São Paulo, v.28, n.3, 2005.

MACKELVEY-MARTIN, V. M.; HO, E. T. S.; MCKEOWN, S. R.; JOHNSTON, S. R.; MCCARTHY, P. J.; RAJAB, N. F.; DOWNES, C. S.. Emerging applications of the single gel electrophoresis (comet) assay. I. Management of invasive transitional cell human bladder carcinoma. II. Fluorescent in situ hybridization comets the identification of damaged and repaired DNA sequences in individual cells., **Mutagenesis**, v.13, n.1, pp.1-8, 1998.

MAGNI, C.; SESSA, F.; ACCARDO, E.; VANONI, M.; MORAZZONI, P.; SCARAFONI, A.; DURANTI, M. Conglutin- γ , a lupin seed protein, binds insulin in vitro and reduces plasma glucose levels of hyperglycemic rats. **J. Nutri. Biochem.**, v.15, p.p.646-650, 2004.

MAJEROWICZ J. **Procedimentos de biossegurança para as novas instalações do laboratório de experimentação animal (LAEAN) de Biomanguinhos**, Dissertação de mestrado apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2005.

MANN, M. D.; CROUSE, D., A prentice ed. Special Topic Overview: Appropriate animal numbers em biomedical research in light of animal welfare considerations. **Lab. Anim Sci.**, v.41, pp.6-14, 1991.

MORITA, T.; ASANO, N.; AWOGI, T.; SASAKI, Y. F.; SATO, S.; SHIMADA, H.; SUTOU, S.; SUZULI, T.; WAKATA, A.; SOFUNI, T.; HAYASHI, M., Evaluation of the rodent micronucleus assay in the screening of IARC carcinogens (Group 1. 2A and 2B). The summary report of the 6th collaborative study by CSGMT/JEMS MMS. **Mut. Res.** n.389, pp.3-122, 1997.

MURILLO, G.; MEHTA, R. G., Cruciferous vegetables and cancer prevention., **Nutrition and Cancer**, v.41, pp.17-28, 2001.

NATIONAL RESEARCH COUNCIL. **Guide for the care and use of laboratory animals, Institute of Laboratory Animal Resources.**, 8° ed. Washington: The National Academies Press, 2008.

NEWELL, L. E; HEDDLE, J. A., The potent colon carcinogen, 1, 2- dimethylhydrazine induces mutations primarily in the colon. **Mut Res.**, v.564, n.1, pp.1-7, 2004.

NICOLETTI, M. A. Principais interações no uso de medicamentos fitoterápicos. **Infarma**, v.19, n.1, 2007.

ODIN, A. P., Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action. **Mutation Research.**, v.386, pp.39-67, 1997.

OHE, T.; WATANABE, T.; WAKABAYASHI, K., Mutagens in surface waters: a review. **Mutation Research**, v.567, pp.109-149, 2004.

OHLWEILER, I. D. **Avaliação da utilização de plantas medicinais por diabéticos**, Trabalho de conclusão de curso (Ciências Farmacêuticas), Universidade Regional de Blumenau, Blumenau, SC, 2007.

OMS/Organização Mundial de Saúde. Situación regulamentaria de los medicamentos: una reseña mundial, 2000.

(OPS) ORGANIZACIÓN PANAMERICANA DE LA SALUD. ANIMALES DELABORATORIO: guia para instalaciones y cuidado de animales de laboratorio., 81p, 1968.

ORESTANO, G., Sull'azione hipoglicemica dei semi di *Lupinus albus*. **Arch. Farmacol.**, v.70, p.p113-117, 1940.

PAKES, S. P.; LU, Y. S.; MEUNIER, P. C. Factors that complicate animal research. In: Fox JG, Cohen BJ, Loew FM, editores. *Laboratory Animal Medicine.*, **Academic Press**; 1984.

PAOLISSO, G.; NENQUIN, M.; SCHMEER, W.; MATHOT, F.; MEISSNER, H. P. E.; HENQUIN, J. C., Sparteine increases insulin release by decreasing K^+ permeability of the B-cell membrane, 1985.

PAULO, P. T. C.; DINIZ, M. F. F. M.; MEDEIROS, I. A.; MORAIS, L. C. S. L.; ANDRADE, F. B.; SANTOS, H. B., Ensaios clínicos toxicológicos, fase I, de um fitoterápico composto (*Schinus terebinthifolius* Raddi, *Plectranthus amboinicus* Lour e *Eucalyptus globulus* Labill). **Rev. Bras. Farmacognosia**, n.19, pp.68-76, 2009.

PECAUT, M. J.; SMITH, A. L.; JONES, T. A.; GRIDLEY, D. S. Modification of immunologic and hematologic variables by method of CO₂ euthanasia. *Comparative Medicine*, v.50, n.6, pp.595-602, 2000.

PEPATO, M. T.; FOLGADO, V. B.; KETTELHUT, I. C.; BRUNETTI, I. L. Lack of antidiabetic effect of a *Eugenia jambolana* leaf decoction on rat streptozotocin diabetes. **J. Med. Biol.**, v. 34, p. 389-395, 2001.

PEREIRA, C. A., **Plantas Tóxicas e Intoxicações na Veterinária.**, Ed. UFG-GO. 1992.

PINTO, E. P; AMOROZO, M. C. M; FURLAN, A., Conhecimento popular sobre plantas medicinais em comunidades rurais de mata atlântica – Itacaré, BA, Brasil, **Acta bot. bras.** v.20, n.4, pp.751-762, 2006.

PITOT, H. C., Animal models of neoplastic development. **Dev Biol.**, vol.106, pp. 53-57, 2001.

PITOT, H. C., Adventures in hepatocarcinogenesis. **Annu Rev Pathol.**, v. 2, pp.1-29, 2007.

POOL-ZOBEL, B. L.; BUB, A.; MÜLLER, H.; WOLLOWSKI, I.; RECHKERMER, G., Consumption of vegetables reduces genetic damage in humans: first results of a human intervention trial with carotenoid-rich foods. **Carcinogenesis.**, v.18, n.9, pp.1847-1850, 1997.

PRENTICE, L. R., Future possibilities in the prevention of breast cancer fat and fiber and breast cancer research. **Breast Cancer Res.**, n. v.4, pp.268-76, 2000.

PRETLOW, T. P., Aberrants crypts: Putative preneoplastic foc in human colonic mucosa. **Cancer Research**, v.51, pp.1564-1567, 1991.

PRYME, I. F.; PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. EWEN, S. W. The induction of gut hyperplasia by phytohaemagglutinin in the diet and limitation of tumor growth. **Histol. Histopathol.**, v.13, pp.575-583, 1998.

PUSZTAI, A.; BARDOCZ, S. Biological effects of plant lectins on the gastrointestinal tract: metabolic consequences and applications. **Trends Glycosci. Glycotech.**, v.8, pp.149, 1996.

RAMEL, C., General environmental modifiers of carcinogenesis, **Acta Pharmacol. Toxicol.**, v.5 , pp.181-196, 1984.

RATES, S. M. K., Promoção do uso racional de fitoterápicos: uma abordagem no ensino de Farmacognosia. **Rev. Bras. Farmacog.**, v.11, n.2, 2001.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K., **Mutagênese ambiental.**, Canoas-RS: Ed. ULBRA, 2003.

RIBEIRO, L. R.; MANTOVANI, M. S.; SALVADORI, D. A. Brazilian natural dietary components (annato, própolis and mushrooms) protecting against mutation and cancer. **Human & Experimental toxicology.**, v.25, n.5, pp.267-272, 2006.

RODRIGUES, M. A. M.; SILVA, L. A. G.; SALVADORI, D. M. F.; CAMARGO, J. L. V.; MONTENEGRO, M. R., Aberrant crypt foci and colon cancer: comparison between a short- and medium term bioassay for colon medium-term bioassay for colon carcinogenesis using dimethylhydrazine in Wistar rats. **J. Med. Biol.**, v.35, n.3, pp.351-355, 2002.

ROSENBERG, D. W.; GIARDINA, C.; TANAKA, T., Mouse models for the study of colon carcinogenesis. **Carcinogenesis.**, v.30, n. 2, pp.183-196, 2009.

ROSSI, B.M. Tumores colorretais hereditários. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v.25, n.4, pp.271-80, 1998.

RUIZ, A. L. T. G.; TAFFARELLO, D.; SOUZA, V. H. S.; CARVALHO, J. E, Farmacologia e toxicologia de *Peumus boldus* e *Baccharis genistelloides*. **Rev Bras Farmacogn**, v.18, pp. 295-300, 2008.

SALGADO, A. R., **Transferência ovariana como alternativa para a restauração das funções reprodutivas em fêmeas de camundongos irradiadas com radiação gama de 60.**, Dissertação de mestrado, São Paulo: 2010. Disponível em: http://pelicano.ipen.br/PosG30/TextoCompleto/AndreiaRuisSalgado_M.pdf. Acesso em 04 de fevereiro de 2013.

SANT'ANA, A. E. G., Em Biodiversidade, Conservação e Uso Sustentável da Flora do Brasil; ARAÚJO, E. L.; MOURA, A. N.; SAMPAIO, E. S. B.; GESTINARI, L. M. S.; CARNEIRO, J. M. T., Imprensa Universitária: UFRPE, Recife, 2002.

SANTOS, R. I., Metabolismo básico e origem dos metabólitos secundários. In: Simões et al. Ed. Farmacognosia: da planta ao medicamento, Porto Alegre/Florianópolis: Universidade/UFRGS/Ed. da UFSC, pp. 323-354, 1999.

SANTOS, S. C, Dissertação de mestrado; caracterização cromatográfica de extratos medicinais de guaco mikania laevigata schultz bip. exbaker e sprengel e ação de m. laevigata na inflamação alérgica pulmonar, Univali, Itajaí, 2005.

SCARAFONI, A., MAGNI, C. E DURANTI, M., Molecular nutraceuticals as a mean m. glomerata to investigate the positive effects of legume seed proteins on human health. **Trends Food Sci. Thecnol.**, v.18, p.p.454-463, 2007.

SCHENKEL, E. P.; GOSMAN, G.; PETROVICK, P. R. **Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos**. In: SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 3. ed. Florianópolis: Ed. da UFRGS/UFSC, 2000.

SIMÕES, C. M. O.; SCHENKEL, E. P.; SIMON, D., **O guia decepar chora de ervas: 40 receitas naturais para sua saúde perfeita.**, Rio de Janeiro: Campus, 2001.

SIMÕES, L. M. C.; GREGÓRIO, L. E.; da SILVA FILHO, A. A.; de SOUZA, M. L.; AZZOLINI, A. E. C. S.; BASTOS, J. K.; LUCISANO-VALIN, Y. M. Effect of Brazilian Green propolis on the production of oxygen species by stimulated neutrophils. **Journal of Ethnopharmacology**, v.94, pp.59-65, 2004.

SKILLER, J. S, Diabetes mellitus: pathogenesis and tratament strategies., **J. Med. Chem.** v.47, pp.4113-4117, 2004.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE DIABETES (SBD) Diretrizes de 2007. Tratamento e acompanhamento do Diabetes mellitus. <http://www.diabetes.org.br/politicas/diretrizesonline.php>. Acesso em: Fevereiro de 2013.

SOUZA, C.; LOPES, T. A.; BATINA, N. P.; CECIM, M.; CUNHA, C. M.; CONRADO, A. C.; ANTÔNIO BECK, A., Estresse parasitário em cabras saanen: avaliação hematológica e da atividade oxidativa dos neutrófilos., **Vet. Not.**, v.12, n.2, pp.17-23, 2006

STEINMETZ, K. A.; POTTER, J. D., Vegetables, fruit, and cancer prevention: a review. *Journal of the American Dietetic Association*, v.96, n.10, pp.1027-1039,1996.

STRACHAN, T. **Human Molecular Genetics**. 2. ed. New York: Wiley-Liss; 1999. Disponível em: <[http:// http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7580/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK7580/)>. Acesso em: fevereiro de 2013.

SUAHEYUN R., KINOUCI T., ARIMOCHI H., VINITKETKUMMUEN U., OHNISHI Y., Inhibitory effects of lemon grass (*Cymbopogon citratus* Stapf) on formation of azoxymethane induced DNA adducts and aberrant crypt foci in the rat colon., **Carcinog.**, v.8, pp.49-55, 1997.

SVENDSEN, P.; HAU, J., **Handbook of Laboratory Animal Seienee**, v. I, Selecting and handling of animals in biomedical research., **CRC Press**, pp.1-191, 1994.

TAGLIATI, C. A.; SILVA, R. P.; FÉRES, C. A. O.; JORGE, R. M.; ROCHA, O. A.; BRAGA, F. C.; Acute and chronic toxicological studies of the Brazilian phytopharmaceutical product Ierobina®. **Rev. Bras. Farmacogn**, v.18, pp.676-682, 2008.

TANAKA, T. Colorectal carcinogenesis: Review of human and experimental animal studies. **Journal Carcinog.**, v.8, n.5, 2009.

TUDEK, B., BIRD, R.P, BRUCE, W.R. Foci of aberrant crypts in the colons of mice and rats exposed to carcinogens associated with foods. **Cancer Res.**, v.49, n.5, pp. 1236-1240, 1989.

TUCKER, J. D.; PRESTON, R. J., Chromosome aberrations, micronuclei, aneuploidy, sister chromatid exchanges, and cancer risk assessment. **Mutat. Res.** v.365, pp.147-159, 1996.

TUROLLA, M. S.; NASCIMENTO, E. S., Informações toxicológicas de alguns fitoterápicos utilizados no Brasil. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, pp. 289-306, 2006.

VASCONCELOS, T. H. C.; MODESTO-FILHO, J.; DINIZ, M. F. F. M.; SANTOS H.B.; AGUIAR, F. B.; MOREIRA, P. V. L., Estudo toxicológico pré-clínico agudo com o extrato hidroalcoólico das folhas de *Cissus sicyoides* L. (Vitaceae)., **Rev Bras Farmacogn**, v.17, pp. 583-591, 2007.

VINCENT T. L, GATENBY R. A., An evolutionary model for initiation, promotion, and progression in carcinogenesis. **Int J of Oncol.**, v. 32, n.4, pp.729-737, 2008.

VOGEL, E. W., **Assessment of chemically-induced genotoxic events: Prospectives and limitations.** Universitaire Pers, 1982.

WAGNER, K. H. Biological relevance of terpenoids overview focusing on mono, di and tetraterpenes. **Annals of Nutrition e Metabolism.**, v.47, pp.95-106, 2003.

WAJCHENBERG, B. L, **Tratado de endocrinologia clínica.**, 1º edição, São Paulo, Ed. Roca, pp.683-684, 1992.

WATERS, M. D., BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E., Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Res.**, v.238, pp.57-85, 1990.

WEISS, D. J.; WARDROP, K. J., **Veterinary Hematology**. 6° ed. Ames: Wiley Blackwell, 2010.

WILLETT, W. C. Diet and breast cancer. *J. Intern. Med.* n.249, pp.395-411, 2001.

WINK, M. Health promoting activities of non-nutricional factores in lupins. **Proceedings of the 11° International Lupin Conference**, México, 2005.