



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS**

DANILO DHEYVISON NASCIMENTO PUREZA

**Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Antigenotoxicidade
do Ácido elágico nanoencapsulado.**

**Macapá
2020**

DANILO DHEYVISON NASCIMENTO PUREZA

**Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Antigenotoxicidade
do Ácido elágico nanoencapsulado.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós –
Graduação em Ciências Farmacêuticas da
Universidade Federal do Amapá para obtenção do
Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes
Monteiro Neto

Co-orientador: Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de
Sousa

**Macapá
2020**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL DA UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ - UNIFAP

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Biblioteca Central da Universidade Federal do Amapá
Elaborada por Cristina Fernandes – CRB-2/1569

Pureza, Danilo Dheyvison Nascimento.

Avaliação da citotoxicidade, cenotoxicidade e antigenotoxicidade do ácido elágico nanoencapsulado / Danilo Dheyvison Nascimento Pureza; Orientador, Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto; Coorientador, Francisco Fábio Oliveira de Sousa. – Macapá, 2020.
83 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Amapá, Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas.

1. Ácido elágico. 2. Nanoencapsulação. 3. Micronúcleo. 4. toxicidade. 5. Mutagenicidade. I. Monteiro Neto, Moacir de Azevedo Bentes, orientador. II. Sousa, Francisco Fábio Oliveira de, coorientador. III. Fundação Universidade Federal do Amapá. IV. Título.

615.32 P985a
CDD. 22 ed.

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas
da Universidade Federal do Amapá**

BANCA EXAMINADORA

Aluno(a): Danilo Dheyvison Nascimento Pureza

Orientador(a): Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto

Co-Orientador(a): Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa


Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto
Membro Titular Presidente/UNIFAP



Dra. Silvia Maria Mathes Faustino
Membro Titular/UNIFAP



Dr. Rafael Lima Resque
Membro Titular/UNIFAP

Data: 10 /07/ 2020

*Dedico esta dissertação a toda minha
família, especificamente ao amor
da minha vida, Karine de Araújo
Marinho e minha mãe Edinelma
Ferreira Nascimento.*

“Algo só é impossível até que alguém duvide e resolva provar o contrário.”

(Albert Einstein)

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador Prof. Dr. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto, pela paciência, apoio, pelos ótimos conselhos durante o desenvolvimento desta pesquisa, sempre me auxiliando e corrigindo minhas falhas durante todo o processo, além de sua amizade;

Ao meu Co-orientador Prof. Dr. Francisco Fábio Oliveira de Sousa e ao Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP, por ter me ajudado com recursos materiais para o desenvolvimento desta pesquisa, pela disponibilidade e ensinamento, que fizeram-me trilhar o caminho certo durante o periodo de toda pesquisa, pela confiança que o mesmo demonstrou ter em minha pessoa e por sua amizade;

A Universidade Federal do Amapá - UNIFAP, pela oportunidade de cursar um curso de pós-graduação na linha de pesquisa pretendida. Importante para quem sonha em seguir carreira em Docência e Pesquisa;

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES / Fundação de Amparo à Pesquisa no Amapá – FAPEAP pelo apoio financeiro concedido através da atribuição de uma bolsa de Mestrado. Pois com o auxilio da mesma, foi possível a realização desta pesquisa por inteira;

Aos meus amigos e colegas de mestrado Everton Pantoja Vale e Lucas Rodrigues do Rego que adquirir durante essa caminhada, pela ajuda, conselho, parceria, trabalho em equipe e por terem feito essa pesquisa se realizar concretamente com ótimos resultados e ao Grupo de Pesquisas Citogenéticas e Biomoleculares (GPCBIO);

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas – PPGCF pelos conhecimentos transmitidos durante todo o curso, pelas dicas e correções que foram feitas ao longo de cada disciplina realizada;

À Deus, por estar sempre ao meu lado, guiando e iluminando meus caminhos, me dando

força e sabedoria para trilhar todos os caminhos da vida e principalmente esta jornada da qual nunca irei esquecer;

A minha mãe e avó, Edinelma Ferreira Nascimento e Elza Ferreira Nascimento, por todo carinho, amor e apoio na minha vida pessoal e profissional, pelos conselhos transmitidos e por me ensinarem a ser uma pessoa melhor, amo vocês de todo o meu coração;

Ao amor da minha vida, Karine de Araújo Marinho, por ter estado comigo em todos os momentos fáceis e difícieis, por ter me apoiado e me incentivado a ser uma pessoa melhor tanto pessoal como profissional, por ter me ajudado durante todo este processo no qual sem a mesma não teria chegado até aqui, dando carinho, atenção e amor, para sempre te amarei;

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma e não foram mencionados aqui, o meu muito obrigado pelo apoio e carinho.

SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS.....	XI
LISTA DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE ANEXOS.....	XIV
SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS.....	XV
RESUMO.....	XVII
ABSTRACT.....	XVIII
1 INTRODUÇÃO.....	19
1.1. ÁCIDO ELÁGICO	21
1.2 NANOENCAPSULAÇÃO.....	23
1.2.1 Zeína.....	24
1.3 MODELO DE ANÁLISE CITOGENOTÓXICO E GENÉTICA TOXICOLÓGICA.....	25
1.3.1 Teste de micronúcleo	28
1.3.2 Doxorrubicina.....	30
2 OBJETIVOS.....	32
2.1. OBJETIVO GERAL	32
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	32
3 MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1 OBTENÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO NANOENCAPSULADO.....	33
3.1.1 Preparação do ácido elágico nanoencapsulado.....	33
3.2 AGENTE QUÍMICO INDUTOR DE DANOS NO DNA	33
3.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS	34
3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL.....	34
3.5 PARÂMETROS AVALIADOS	37

3.5.1	Massa corpórea.....	37
3.5.2	Teste do micronúcleo	37
3.5.3	Análise das lâminas.....	38
3.5.4	Análise macroscópica, peso relativo e microscópico dos órgãos	40
3.5.4.1	Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos.....	40
3.5.4.2	Análise microscópica dos órgãos.....	40
3.5.4.2.1	<i>Fígado.....</i>	40
3.5.4.2.2	<i>Baço.....</i>	41
3.5.4.2.3	<i>Coração</i>	41
3.5.4.2.4	<i>Rins.....</i>	42
3.6	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	42
4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	43
4.1.	ÁCIDO ELÁGICO NANOENCAPSULADO, ÁCIDO ELÁGICO EM SOLUÇÃO LIVRE E NANOPARTÍCULAS EM BRANCO.	43
4.1.1	Massa corpórea dos animais	43
4.1.2	Teste de micronúcleo	44
4.1.2.1	Genotoxicidade e antigenotoxicidade do ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco.....	44
4.1.2.2	Índice de divisão nuclear - citotoxicidade do Ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco.....	49
4.1.3	Análise macroscópica, peso relativo e microscópica dos órgãos	50
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	53
	REFERÊNCIAS	54
	Anexo 01 – Parecer do Comitê de Ética	65
	Anexo 02 – Comprovante de submissão na <i>Food and Chemical Toxicology</i> do manuscrito: Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of nanoencapsulated ellagic acid	66
	Anexo 03 – Manuscrito: Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of nanoencapsulated ellagic acid	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 –	Grupos experimentais e protocolos de tratamentos para teste do micronúcleo para genotoxicidade utilizando o ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco(zeína) (21 dias de tratamento)	36
Tabela 02 –	Grupos experimentais e protocolos de tratamentos para teste do micronúcleo para antigenotoxicidade utilizando ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) (21 dias de tratamento)	36
Tabela 03 –	Média e desvio padrão das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) em sangue periférico de camundongos Swiss (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) de animais tratados com a mesma concentração de ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) e seus respectivos controles.....	45
Tabela 04 –	Índice de divisão nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos as mesmas concentrações de ZNP-EA e/ou DXR; EAS e/ou DXR e BNZp e/ou DXR; e seus respectivos controles, (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) após tratamentos.	50
Tabela 05 –	Efeito do ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) sobre a massa média dos órgaos dos animais tratados durante 21 dias com as mesmas concentrações.....	51

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 –	Estrutura química do ácido elágico.....	21
Figura 02 –	Diferentes efeitos de xenobióticos nos eritrócitos.....	26
Figura 03 –	Eritrócitos como modelo para avaliar efeitos citogenotóxicos de xenobióticos.....	26
Figura 04 –	Mecanismo anticâncer de compostos fenólicos de produtos naturais durante a carcinogênese.....	28
Figura 05 –	Formação de micronúcleo	29
Figura 06 –	Eritrócito Policromático Micronucleado (EPCMn)	30
Figura 07 –	Estrutura química da Doxorrubicina	30
Figura 08 –	Camundongo Swiss (macho) com 6 - 7 semanas.....	34
Figura 09 –	Acondicionamento dos camundongos Swiss por grupo de tratamento - A e B	35
Figura 10 –	Concentrações do ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco	35
Figura 11 –	Esfregaço sanguíneo (A) e secagem das lâminas à temperatura ambiente (B)	38
Figura 12 –	Fixação das amostras com metanol - (A); Lâminas coradas com Giemsa prontas para análises - (B)	38
Figura 13 –	Eritrócitos Normocromáticos - ENC - (A); Eritrócitos Policromáticos - EPC -(B); Eritrócitos Policromáticos Micronucleados - EPCMN (C) ...	39

Figura 14 – Massa corpórea média dos animais tratados com as mesmas concentrações de ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) durante 21 dias, sobre a Massa Inicial - (A) e Massa Final - (B). Os valores foram expressos como Média ± Desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados em comparação com o grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey). DXR: Doxorrubicina..... 44

Figura 15 – Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) tratados com as mesmas concentrações de ácido elágico nanoencapsulado + DXR (24 e 48 horas); ácido elágico em solução livre + DXR (24 e 48 horas); nanopartículas em branco (zeína) + DXR (24 e 48 horas) e seus respectivos controles. Os valores foram expressos como Média ± Desvio padrão. Houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com o grupo DXR em comparação aos grupos de tratamento (ANOVA e Teste de Tukey). EPCs: Eritrócitos Policromáticos; DXR:Doxorrubicina..... 47

Figura 16 – Análises Histopatológicas dos órgãos Coração, Baço, Fígado e Rins dos submetidos a tratamento com as substâncias ácido elágico nanoencapsulado, nanopartículas em branco e ácido elágico em solução livre..... 51

LISTA DE ANEXOS

Anexos 01 –	Parecer do Comitê de Ética.....	65
Anexos 02 –	Comprovante de submissão na <i>Food and Chemical Toxicology</i> do manuscrito: Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of nanoencapsulated ellagic acid	66
Anexo 03 –	Manuscrito: Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of nanoencapsulated ellagic acid	67

SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

%	Porcentagem
±	Mais ou menos
µg	Microgramas
ºC	Grau Celsius
AE	Ácido elágico
ANOVA	Análise de variância
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BNZP	Nanopartículas em Branco (zeína)
CEMIB	Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
Cm	Centímetro
CN	Controle Negativo
CP	Controle Positivo
DP	Desvio padrão
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DXR	Doxorrubicina
EAS	Ácido elágico em solução livre
ENC	Eritrócito Normocromático
EPCMN	Eritrócitos Policromáticos Micronucleados
EROs	Espécies reativas de oxigênio
EPC	Eritrócitos Policromático
g	Gramma

i.p.	Intraperitoneal
IDN	Índice de divisão nuclear
Kg	Quilograma
m	metro
mg	Miligramas
mL	Mililitro
MN	Micronúcleo
MR	Massa relativa
MS	Ministério da Saúde
PMs	Plantas medicinais
p.c.	Peso corpóreo
PNPIC	Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares
PNPMF	Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos
v.o	Via oral
UNIFAP	Universidade Federal do Amapá
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
ZNP-EA	Ácido Elágico Nanoencapsulado

Avaliação da Citotoxicidade, Genotoxicidade e Antigenotoxicidade do Ácido elágico nanoencapsulado.

O ácido elágico é um fitoquímico fenólico de ocorrência natural pertencente ao grupo dos elagitaninos, que por sua vez pertencem ao grupo de taninos hidrolisáveis dos polifenóis. O mesmo pode ser encontrado em plantas em sua forma livre, ou na forma de elagitaninos, e na membrana celular. A Zeina é um polímero natural cujo potencial biológico também ganhou atenção. O Objetivo deste trabalho foi valiar o potencial citotóxico, genotóxico, antigenotóxico e histopatológico do ácido elágico nanoencapsulado pelo sistema-teste *in vivo*. O método utilizado para determinar o efeito citotóxico foi determinado pelo cálculo do índice de divisão nuclear (IDN). Para determinação da genotoxicidade e antigenotoxicidade foi utilizado método do teste do micronúcleo em células do sangue periférico de camundongos Swiss machos provenientes do Biotério da Universidade Estadual de Campinas. Para avaliação genotóxica os animais foram tratados com ácido elágico nanoencapsulado (ZNP-EA); ácido elágico em solução livre (EAS) e nanopartículas em branco (BNZp) cada solução com uma concentração de 5,3 mg/kg p. c.. As amostras do sangue periféricos foram coletadas 24, 48 horas 7, 14 e 21 dias para o tratamento subcrônico. Para o efeito antigenotóxico os animais foram tratados com as concentrações pré-estabelecidas, seguida de injeção intraperitoneal de doxorubicina - DXR (15 mg/kg p. c.). As substâncias administradas não revelaram atividade genotóxica comparadas ao grupo controle negativo. Porém quando administradas com DXR mostraram uma atividade antigenotóxica com taxa de redução de 92,01% em 48 horas comparado com o grupo controle positivo mostrando que a mesma foi capaz de diminuir os micronúcleos em eritrócitos policromáticos. Não houve citotoxicidade nas substâncias testadas e o resultado Histopatológico revelou que não houve toxicidade com relação aos órgãos fígado, baço, coração e rins. Os resultados reforçam o potencial do ácido elágico em combinação com zeína fornecendo o grande potencial antioxidante e antigenotóxico da mesma.

Palavras-Chave: Ácido elágico; Nanoencapsulação; Micronúcleo; toxicidade; Mutagenicidade.

ABSTRACT

Evaluation of Cytotoxicity, Genotoxicity and Antigenotoxicity of Nanoencapsulated ellagic acid.

Ellagic acid is a naturally occurring phenolic phytochemical belonging to the group of ellagitannins, which in turn belong to the group of hydrolyzable tannins of polyphenols. The same can be found in plants in their free form, or in the form of ellagitannins, and in the cell membrane. Zeina is a natural polymer whose biological potential has also gained attention. The objective of this research was to evaluate the cytotoxic, genotoxic, antigenotoxic, and histopathological potential of nanoencapsulated ellagic acid using an in vivo test system. The method used to determine the cytotoxic effect was determined by calculating the nuclear division index (IDN). To determine genotoxicity and antigenotoxicity, the micronucleus test method was used in peripheral blood cells of male Swiss mice from the Vivarium of the State University of Campinas. For genotoxic evaluation, the animals were treated with nanoencapsulated ellagic acid (ZNP-EA); ellagic acid in free solution (EAS) and blank nanoparticles (BNZp) each solution with a concentration of 5.3 mg / kg p. c .. Peripheral blood samples were collected 24, 48 hours 7, 14 and 21 days for the subchronic treatment. For the antigenotoxic effect, the animals were treated with pre-established concentrations, followed by intraperitoneal injection of doxorubicin - DXR (15 mg / kg p. C.). The administered substances did not show genotoxic activity compared to the negative control group. However, when administered with DXR they showed an antigenotoxic activity with a reduction rate of 92.01% in 48 hours compared with the positive control group showing that it was able to decrease micronuclei in polychromatic erythrocytes. There was no cytotoxicity in the tested substances and the Histopathological result revealed that there was no toxicity in relation to the liver, spleen, heart and kidney organs. The results reinforce the potential of ellagic acid in combination with zein, providing its great antioxidant and antigenotoxic potential.

Key words: Ellagic acid; Nanoencapsulation; Micronucleus; toxicity; Mutagenicity.

Ao longo dos tempos a sabedoria popular vem sendo transmitida de forma empírica entre as gerações. O conhecimento tradicional sobre o uso das plantas é vasto e, em muitos casos, é o único recurso disponível que a população rural de países em desenvolvimento tem ao seu alcance.

Diante desta situação, torna-se necessário uma maior valorização desta cultura e a recuperação do conhecimento que a população detém sobre o uso dos recursos naturais. O resgate de tais informações assume um papel indispensável, impedindo a sua perda com o passar dos anos, além de contribuir para a ciência contemporânea.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 65% da população mundial incorporam o uso de plantas da medicina tradicional aos cuidados médicos. Diversos estudos ao longo dos anos permitiram fazer uma associação entre diferentes espécies medicinais e suas respectivas atividades biológicas a partir da observação, descrição e investigação experimental.

Com o advento da revolução científica e da revolução industrial, práticas terapêuticas que não apresentassem evidências científicas com base em métodos experimentais e em fenômenos matemáticos quantificáveis foram marginalizadas. Novas maneiras de tratar e curar as doenças foram surgindo com o uso dos +, que ganharam notoriedade com o desenvolvimento do modelo científico experimental em detrimento do uso de plantas medicinais.

As plantas medicinais possuem substâncias que podem ser utilizadas com propósitos terapêuticos ou que sejam precursoras de semissíntese químico-farmacêutica. Além disso, com o intuito de proteção e adaptação, as plantas biosintetizam substâncias, conhecidas como metabólitos secundários, que desempenham importantes atividades biológicas. Entre esses metabólitos secundários, o ácido elágico que é um polifenol descrito na categoria de elagitanino, assim como os demais taninos, são produzidos pelo sistema de defesa da planta contra o ataque microbiano e de animais, além disso, apresenta diversas atividades biológicas (COLARES et al., 2017; MANSOURIAN et al., 2014).

A necessidade de se chegar ao fundamental de tudo o que existe ronda a ciência e paralisa diversas áreas do conhecimento, tais como matemática, química, física e biologia que, juntas, tentam não apenas conhecer em profundidade, mas também, manipular a estrutura básica de todos os materiais identificados pela humanidade.

Entre essas manipulações destaca-se a nanotecnologia que usa técnicas com átomos e moléculas individualmente para a produção de materiais nanoestruturados e micro-objetos para diversos fins terapêuticos (MILLER et al., 2005).

Ela resiste na produção e aplicação em sistemas físicos, químicos e biológicos em escalas de um átomo individual a moléculas de cerca de 100 nanômetros, assim como a integração e interação das nanoestruturas resultantes em sistemas mais complexos (BASTOS, 2006).

Apesar da grande evolução da medicina alopática (fitoterápica), ainda existem obstáculos básicos na sua utilização pelas populações carentes, que vão desde o acesso aos centros de atendimento hospitalares à obtenção de exames e medicamentos. Estes motivos, associados com a fácil obtenção e a grande tradição do uso de plantas medicinais, contribuem para sua utilização pelas populações dos países em desenvolvimento. Para tanto, faz-se a seguinte pergunta: Quais as propriedades citotóxicas, genotóxicas, antigenotóxicas em células do organismo com a utilização do ácido elágico nanoencapsulado (ZNP-EA) ?.

Se por meio da metodologia empregada for possível determinar esses possíveis efeitos descritos anteriormente pelo ácido elágico nanoencapsulado (ZNP-EA), será possível determinar e entender as propriedades deste composto químico isolado nanoencapsulado, e propor medidas eficientes para a utilização do mesmo, pois a metodologia proposta fornece melhor entendimento sob a capacidade genotóxica e antigenotóxica.

Os efeitos benéficos do ácido elágico (EA) também já são demostrados na atualidade, porém até que ponto? Devido a isso, é importante realizar estudos citogenéticos para avaliar o potencial genotóxico, citotóxico e antigenotóxico no organismo, ocasionada pelo uso deste composto químico de forma isolada, comparando assim, os efeitos do Ácido elágico nanoencapsulado (ZNP-EA).

O AE é um polifenol descrito na categoria de elagitanino, bem como os demais taninos, são produzidos por um sistema de defesa da planta contra ataques microbianos e externos como de animais, além disso, nos organismos humano e de mamíferos, produzem diversos resultados favoráveis (MANSOURIAN et al., 2014; COLARES et al., 2017).

Embora os usos do AE sejam bastante difundidos para finalidades terapêuticas, torna-se necessária tomar certos cuidados, pois pouco se sabe a respeito de seus possíveis efeitos citogenéticos e toxicológicos, tanto para o homem quanto para os mamíferos, carecendo assim, de maiores números de estudos abordando este contexto (BRAQUEHAIS, et al., 2016).

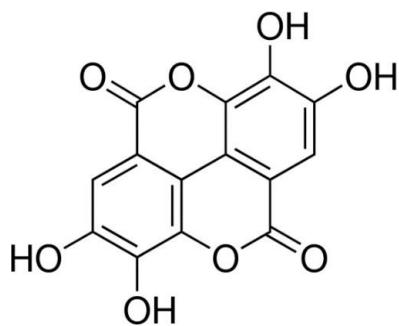
Neste sentido, há grande relevância de se avaliar seus níveis de produzir efeitos genotóxico, antigenotóxico, citotóxico, garantindo assim, uma segurança maior para a população que faz uso dessa substância - (AE) de forma isolada ou de produtos que contenham a mesma em sua constituição fitoquímica. Estes fatores motivaram a realização e produção deste estudo em investigar essas propriedades citogenéticas e seus efeitos toxicológicos em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss com a utilização subaguda da solução de ZNP-EA, EAS e BZNp.

1.1 ÁCIDO ELÁGICO

O ácido elágico (AE) (2, 3, 7,8-tetrahidroxi-cromeno [5, 4,3-cde]-cromeno- 5,10-diona, H4EA) é um composto fenólico de ocorrência natural pertencente ao grupo dos elagitaninos (ET), que por sua vez está intimamente ligado à classe dos taninos hidrolisáveis dos polifenóis. Os ET são ésteres de glicose com AE que, quando hidrolisados (hidrólise ácida ou básica), fornecem o ácido hexahidroxidifênico, que se rearranja espontaneamente em AE (CELIK et al., 2013).

O AE pode ser encontrado em plantas em sua forma livre, ou na forma de elagitaninos (presentes como componentes estruturais da parede da célula vegetal), e na membrana celular. O AE está presente em frutas como as “berries” (morango, framboesa, amora, mirtilo, uva, cereja, dentre outras), está presente também na romã, nozes, amêndoas, sementes e bebidas fermentadas (CELIK et al., 2013; GALANO et al., 2016; VATTEM; SHETTY, 2005).

Figura 1: Estrutura química do ácido elágico



Fonte: Sigma-Aldrich (www.sigmaaldrich.com)

Uma pesquisa realizada por Abe e colaboradores (2012), para investigar a quantidade de ácido elágico em frutas consumidas no Brasil, identificou que dentre 35 frutas, aquelas pertencentes às famílias *Myrtaceae*, *Punicaceae* e *Rosaceae* foram as que apresentaram grande quantidade de AE.

Alguns estudos envolvendo o AE evidenciaram que este composto possui uma ampla gama de efeitos biológicos, como: atividade antimutagênica, antioxidante, anti inflamatória , (CELIK et al., 2013; VATTEM; SHETTY, 2005); anti-viral, antibacteriana (capaz de agir contra *Escherichia coli*, *Pseudomas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Helicobacter pylori*), gastroprotetora e cardioprotetora (GALANO et al., 2016); anti aterosclerótica, antihepatotóxica e inibidora da DNA topoisomerase (VATTEM; SHETTY, 2005).

As propriedades biológicas do AE o tornam um grande promissor ao combate contra as doenças crônicas, como a hipertensão. Segundo um estudo in vitro realizado por Yilmaz e Usta (2013) foi constatado a ação desse polifenol em promover o vasorrelaxamento em artérias aortas

isoladas de ratos. Somado a essas informações Berkban e colaboradores (2015), introduziram AE na água de beber de ratos, demonstrando a capacidade do AE em reduzir os níveis pressóricos dos animais hipertensos bem como reduzir os níveis do marcador de peroxidação lipídica.

Formados a partir do metabolismo secundário de plantas, os polifenóis estão envolvidos na proteção contra radiação ultravioleta e patógenos agressores (Manach et al, 2004) Os efeitos biológicos dos polifenóis são frequentemente atribuídos a uma ação antioxidante direta, mais especificamente por mecanismos sequestrador de radicais livres (Virgili & Marino, 2008; Perron & Brumaghim, 2009).

Desta forma, o estresse oxidativo surge do desequilíbrio entre as produções de espécies reativas de oxigênio (EROs), podendo causar danos graves as proteínas, lipídios, material genético e até mesmo resultar na morte celular. De tal modo, os excessos de radicais livres são considerados um perigo para à saúde humana, podendo desencadear inúmeras doenças cardiovasculares, renais e o surgimento do próprio câncer (WANG, ZHAO, 2019).

Muitos autores demonstraram que o AE possui atividade antimutagênica, anticarcinogênica e antioxidante (Ayrton et al., 1992; Huetz et al., 2005; Loarca-Pina et al., 1998; Priyadarsini et al., 2002; Ginani, 2005; Dalvi, 2008).

Entretanto, os mecanismos pelos quais o AE exerce tais ações ainda não foram totalmente esclarecidos. Estudos realizados com AE contra a ação de diferentes variedades de carcinógenos (incluindo nitrosaminas, azoximetano, micotoxinas e hidrocarbonos aromáticos policíclicos) demonstraram que um dos mecanismos anticarcinogênico e antimutagênico proposto para o AE estaria relacionado com a otimização do metabolismo desses carcinógenos (Szaefer et al., 2003; Loarca-Pina et al., 1998; Smith et al., 1998; Takagi et al., 1995).

Os estudos indicam que o AE seria capaz de inibir a mutagênese e a carcinogênese por meio: i) da inibição de enzimas responsáveis pela bioativação de carcinógenos, como as da família do citocromo P450, ii) da estimulação de enzimas envolvidas na detoxificação de intermediários reativos, como glutationa-Transferase, e iii) por meio da interação direta do polifenol com os intermediários reativos formando adutos inativos (Szaefer et al., 2003).

Estudos in vitro demonstraram que AE também é capaz de se ligar ao DNA, o que impediria a ligação de agentes mutagênicos e carcinogênicos em alguns sítios específicos do DNA (Dalvi, 2014).

A atividade do AE em modular enzimas envolvidas no metabolismo de carcinógenos foi evidenciada em diferentes estudos realizados com este polifenol. Ayrton e colaboradores (1992) demonstraram que a administração de AE intraperitoneal reduz os níveis totais de citocromo P450 em aproximadamente 50% (Ayrton et al., 1992).

O ácido elágico também é capaz de se ligar ao DNA de forma covalente, o que impediria a

ligação de agentes mutagênicos e carcinogênicos em alguns sítios específicos (DALVI, 2014).

A atividade antioxidante do AE também já foi demonstrada, porém os estudos sobre este assunto ainda são escassos. Pryadarsini e colaboradores (2002), ao estudar a natureza antioxidante do ácido elágico, comprovou sua habilidade em seqüestrar espécies reativas de oxigênio. Desta forma, podem atuar contra o estresse oxidativo, uns dos principais responsáveis por ocasionar danos oxidativos no organismo, além de atuar indiretamente na ativação dos sistemas enzimáticos celulares antioxidantes (MEHRZADI, et al., 2018).

Por essa razão, os efeitos produzidos pelo ácido elágico na prevenção de doenças relacionadas à oxidação têm sido amplamente estudados.

Neste contexto, principalmente pelo excepcional efeito terapêutico do ácido elágico, a comunidade científica internacional buscou e expandiu novos estudos relacionados a este metabólito de uso medicinal nessas últimas décadas, com o intuito de conhecer melhor seus potenciais efeitos terapêuticos para a saúde da população, melhorando assim, o bem-estar coletivo (ISMAIL; SESTILI; AKHTAR, 2012).

Embora vários estudos tenham focados em diferentes atividades biológicas do ácido elágico, pouco foco foi dado aos efeitos sobre o material genético. Sabe-se que o AE podem induzir apoptose e inibir a proliferação de vários tipos de células cancerígenas *in vitro* e *in vivo*. (BOEHNING, et al., 2018). Como tal, o AE atrai um interesse significativo como um potencial composto quimioterapêutico, podendo proporcionar uma qualidade de vida melhor a saúde humana, além disso, estudos focados nesta substância, podem contribuir para o conhecimento sobre os verdadeiros efeitos do AE no organismo.

1.2 NANOENCAPSULAÇÃO

As nanopartículas são definidas como partículas de caráter sólido e tamanho sub-micro, com diâmetros que alternam entre um nanômetro e várias centenas de nanômetros, podendo ou não ser biodegradáveis (REIS et al., 2007). O termo nanopartícula é também uma designação coletiva tanto para nanoesferas como nanocápsulas. As nanoesferas caracterizam-se por possuírem uma estrutura do tipo matricial, e tal como nas microesferas, as substâncias ou entidades ativas podem estar adsorvidas à superfície ou retidas no interior da esfera. Por outro lado as nanocápsulas caracterizam-se por serem sistemas vesiculares onde as substâncias ou entidades encontram-se internamente confinadas a uma cavidade composta por um núcleo interior líquido que se encontra revestido por uma membrana (BRIGGER; DUBERNET; COUVREUR, 2002).

As nanopartículas têm recebido cada vez mais atenção por parte da indústria farmacêutica como sendo uma opção para melhorar e prolongar a administração de fármacos ou entidades

ativas. A nanoencapsulação de substâncias ou entidades ativas caracteriza-se pela formação de partículas que se encontram carregadas com diâmetro entre 1 e os 1000 nm (COUVREUR; DUBERNET; PUISIEUX, 1995).

Comparados com diversas formas farmacêuticas convencionais, os sistemas de nanopartículas oferecem grandes vantagens, como: o aumento da eficácia da terapia, a liberação controlada e/ou vetorizada e a redução ou limitação de efeitos adversos que estão associados ao fármaco ou ao composto encapsulado, vantagens que no seu todo trazem outro grande benefício, o aumento da adesão do doente à terapêutica (BURGESS; HICKEY, 2002).

O tamanho sub-micro das nanopartículas oferece ainda algumas vantagens em comparação com as micropartículas, como por exemplo, uma absorção intracelular significativamente superior. Além do tamanho, a carga da nanopartícula também influencia a absorção, mais especificamente a nível intestinal. (MCLEAN et al., 1998).

A nanoencapsulação é uma tecnologia que vem crescendo rapidamente e que permite confinar compostos com atividades biofarmacêuticas sob a forma de nanopartículas. Os compostos confinados, encapsulados ou absorvidos dentro das nanocápsulas vão desde fármacos ativos e pró-fármacos até outras moléculas com atividades biológicas ativas, como por exemplo, proteínas, enzimas (MOUTINHO et al., 2012).

A nanoencapsulação envolve a incorporação ou dispersão de combinações de entidades ou substâncias que podem se encontrar no estado sólido, líquido ou gasoso, aprisionados em vesículas pequenas, com diâmetro na escala nanométrica. A incorporação destas substâncias bioativas protege-as contra a degradação que podem ser causadas por agentes ambientais como o pH, a temperatura, sais e solventes orgânicos, além de melhorar a estabilidade e a solubilidade, e permite ainda a solubilização de componentes hidrofóbicos em matrizes hidrofílicas e vice-versa (JAFARI et al., 2008).

O principal objetivo da encapsulação é proteger uma substância sensível no interior da cápsula ou na sua parede, através do isolamento físico do meio, com isso permitindo simultaneamente a transferência de gases, nutrientes ou metabólitos (REIS et al., 2006).

1.2.1 Zeína

A zeína, uma das principais proteínas de armazenamento do milho, é excelente meio para produção de nanopartículas (WANG; YIN; PÁDUA, 2008). Sendo utilizada na formação de nanopartículas para a encapsulação de óleos essenciais (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005); vitaminas (LUO; TENG; WANG, 2012); agente quimioterapêutico (LAI,; GUO, 2011) entre outros compostos. Apresentam reconhecida capacidade de revestimento para compostos bioativos

(LAWTON, 2002; SHUKLA; CHERYAN, 2001; HAMAKAR et al., 1995).

Cerca de 50 % do total de aminoácidos presentes na zeína são de caráter não polar (leucina, alanina e prolina). Dando a esta, comportamento anfifílico, mais especificamente, como uma proteína hidrófoba e, por conseguinte, solúvel em etanol, acetona ou acetil acetona e insolúvel em água (SHUKLA; CHERYAN, 2001; HAMAKAR et al., 1995).

Essa característica serve como uma excelente barreira à água, possibilitando utilizá-la como um material de revestimento em micro e nanopartículas. Outra característica relevante da zeína, é sua resistência às enzimas digestivas, resultando em uma digestibilidade mais lenta no trato gastrointestinal. Esta propriedade pode ser explorada para liberação controlada de componentes funcionais (LUO; WANG, 2014).

A zeína apresenta-se como importante material de revestimento, por possuir características como: fonte natural e renovável, biodegradabilidade, baixo custo, biodisponibilidade, longo histórico de uso (PATEL; VELIKOV, 2011; LIN et al., 2011; LUO et al., 2010; SHUKLA; CHERYAN, 2001) hidrofobicidade, bioadesão, alta capacidade formadora de filme, boa capacidade de ligação com fármacos, elasticidade e potencial de absorção celular (LUO et al., 2013; PATEL; VELIKOV, 2011; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; HAWKINS; SOONSHIONG; DESAI, 2008; WANG et al., 2005; SHUKLA; CHERYAN, 2001).

1.3 MODELO DE ANÁLISE CITOGENOTÓXICO E GENÉTICA TOXICOLÓGICA

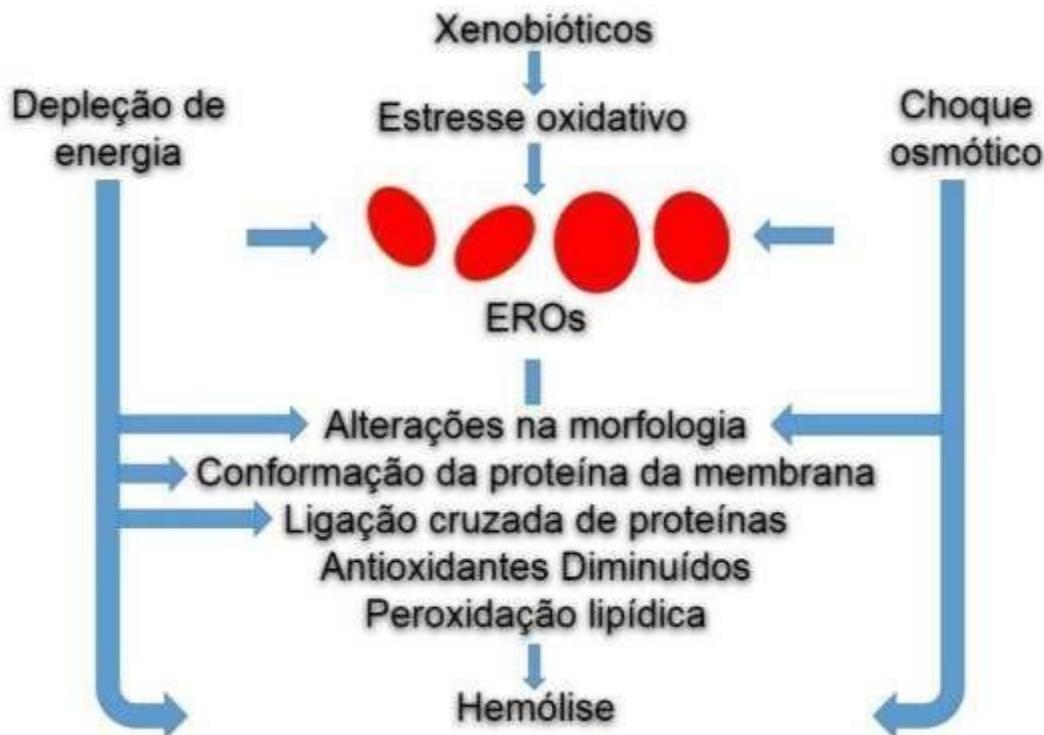
Os glóbulos vermelhos (eritrócitos) são considerados uma das principais células do corpo humano. Em mamíferos, os eritrócitos apresentam uma característica morfológica bastante específica, sendo desprovidas de núcleos e outras organelas celulares, constituída por uma membrana plasmática com composição e estrutura específicas altamente correlacionadas com suas funções biológicas (oxigenação do organismo através do transporte de O₂ e CO₂), além de possuir um tempo de vida de aproximadamente 120 dias (MOHANDAS, CHASIS, SHOHET, 1983; FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Neste contexto, diversas substâncias tóxicas (metais, pesticidas, agentes químicos, biológicos, irradiação, produtos naturais e alguns tipos de drogas) podem desencadear danos direto ou indireto ao citoesqueleto dos eritrócitos e alterar o metabolismo celular e sua permeabilidade iônica, desencadeando anormalidades em sua morfologia e consequentemente a morte celular (Figura 02).

Desta forma, os eritrócitos são desprovidos de estruturas de membrana interna e fáceis de serem isolados e manipulados, fornecendo um bom modelo para diferentes ensaios. Devida a esses fatores, diferentes estudos utilizam os eritrócitos como modelo para avaliar possíveis

efeitos citogenotóxicos de diferentes substâncias, através da análise de diferentes parâmetros (Figura 03).

Figura 02: Diferentes efeitos de xenobióticos nos eritrócitos.



Fonte: Adaptado de Farag e Alagawany (2018).

Figura 03: Eritróцитos como modelo para avaliar os efeitos citogenotóxicos de xenobiótico.



Fonte: Adaptado de Farag e Alagawany (2018).

Çömelekoğlu (2000) e colaboradores, concluíram que alguns pesticidas podem desencadear alterações no tamanho e nas formas superficiais dos eritrócitos humanos. Além disso, Koç, et al. (2008) demonstraram os efeitos do malatião e do endossulfan *in vivo* (1,0 mg / kg de peso corporal por 15 dias) evidenciando defeitos estruturais e alterações nas formas superficiais das hemárias de ratos. Suwalsky et al. (2008), relataram que as hemárias humanas, quando incubadas com extrato aquoso (0,5 g de pó seco) de *Aristotelia chilensis* (0,5 mL de 1% de extrato), apresentavam alterações morfológicas representadas pela forma equinocítica.

Esses danos, em sua grande maioria, só podem ser detectados após exposição com esses produtos. Sendo assim, a genética toxicológica tem por objetivo detectar e entender as ações (endógenas e exógenas) de quaisquer agentes físicos, químicos ou biológicos que possam produzir esse efeito genotóxico sobre o material genético (ácido desoxirribonucleico - DNA) (FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Neste contexto, o termo genotóxico se refere às alterações (mutações) letais e/ou hereditárias no DNA, que são transmitidas, tanto pelas células somáticas quanto pelas germinativas, e em sua grande maioria, podem desenvolver uma série de problemas maléficos, incluído o surgimento de câncer (iniciação, promoção, progressão, invasão e metástase) (DOLL; PETO, 1981; DA SILVA et al., 2011; DA FONSECA; PEREIRA, 2013; ERMOLAEVA; SCHUMACHER, 2014).

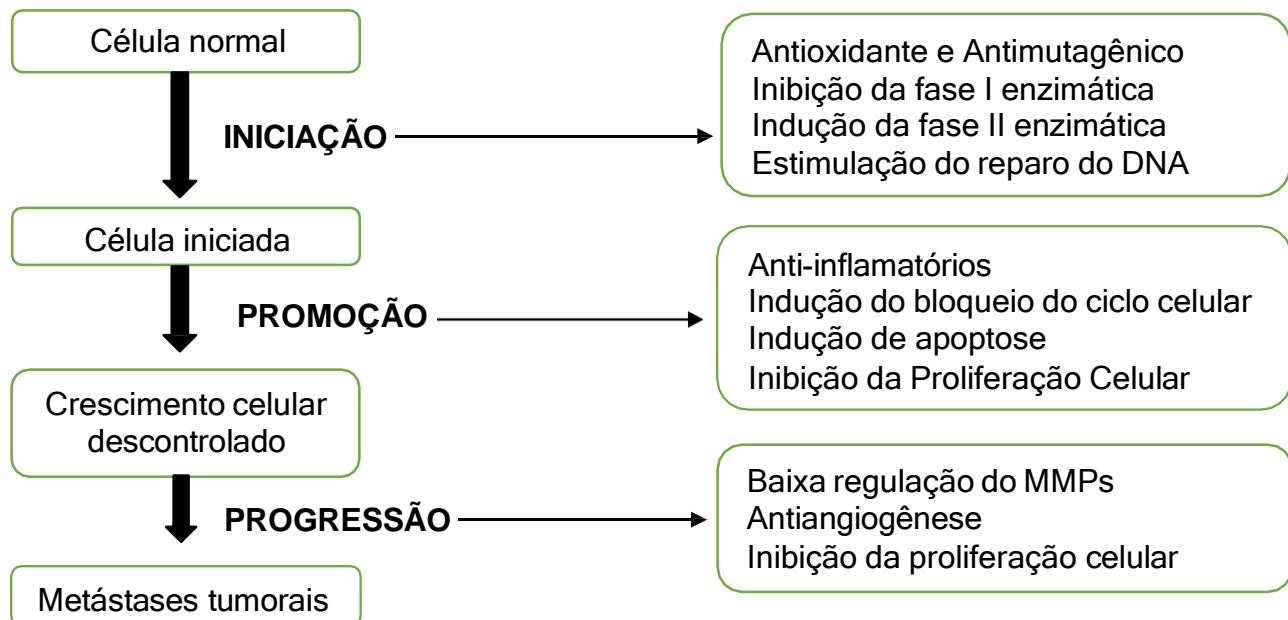
Essas mutações são classificadas basicamente em duas grandes categorias: mutações gênicas e cromossômicas. As mutações gênicas, são alterações que ocorrem na sequência de nucleotídeos do DNA do indivíduo e as cromossômicas são as que produzem alterações no número ou na estrutura dos cromossomos, nas quais são detectadas por análises citogenéticas (LUCIO NETO, 2011).

Para minimizar esses danos ao DNA, existem substâncias denominadas antimutagênicos, caracterizados como agentes que tem a capacidade de diminuir as frequências de mutações no material genético, deste modo, desempenham um papel fundamental na manutenção da transmissão de informações genéticas. Essas substâncias são classificadas como desmutagênicos, desempenhando a função de proteção contra substâncias mutagênicas antes de agirem sobre o DNA e as substâncias bio- antimutagênicas que são aquelas que agem sobre os processos metabólicos de reparação (COSTA, 2018).

Neste contexto, as plantas medicinais são constituídas por diferentes compostos fenólicos, como descritos anteriormente, e possuem a capacidade de inibir a carcinogênese através de dois mecanismos: pela modificação do estado de redox e pela ação sobre as funções celulares básicas, tais como inflamação, ciclo celular, angiogênese, apoptose, invasão e metástase (KAMPA et al., 2007). Deste modo, algumas plantas medicinais podem intervir nas etapas da

carcinogênese por meio desses mecanismos, minimizando assim, esses danos provocados por fatores externos ou internos ao organismo (Figura 04).

Figura 04: Mecanismos anticâncer de compostos fenólicos de produtos naturais durante a carcinogênese.



Fonte: Adaptado de Dai e Mumper (2010).

Além disso, podemos avaliar a toxicidade de uma substância através do tempo de exposição a esses produtos, com base nisto, a toxicidade é classificada como agudo, caracterizado pelo surgimento dos efeitos tóxicos em animais por uma única ou por múltiplas exposições a uma substância, por qualquer via, por curto período de tempo. A toxicidade subcrônica, em que os efeitos tóxicos são produzidos por exposições diárias repetidas a uma substância, com um período de aproximadamente 10% do tempo de vida de exposição do animal ou alguns meses, e a crônica, na qual os efeitos tóxicos ocorrem após repetidas exposições, por um período longo de tempo, geralmente durante toda a vida do animal ou aproximadamente 80% do tempo de vida (MORAIS, et al., 2017).

Logo, pesquisas de produtos naturais ou sintéticos que possuem ações biológicas favoráveis aos seres humanos e que apresentem em suas propriedades, um potencial antimutagênico, tem grande relevância, uma vez que, na atualidade é considerado um dos principais fatores que contribuem para a longevidade, além de prevenir e combater até mesmo o surgimento de tumores (COSTA, 2018).

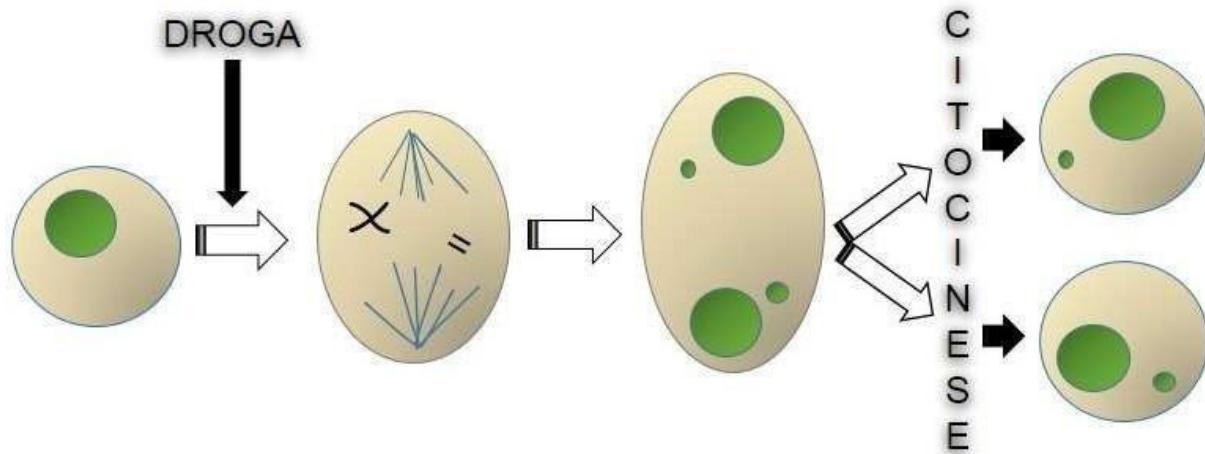
1.3.1 Teste de micronúcleo

O Teste do Micronúcleo é um método simples na avaliação de diversos tipos de danos citogenéticos, detectando mutações cromossômicas do tipo clastogênica, aneugênica e danos no

fuso mitótico. O mesmo foi desenvolvido por Matter e Schmid (1971), através de estudos realizados em eritrócitos de medula óssea de camundongo (*in vivo*) e posteriormente, Heddle (1976), realizou estudos (*in vitro*) em linfócitos do sangue periférico humano (QUEIROZ, 2017).

Desde modo, este teste é considerado um biomarcador sensível em condições de campo e em laboratório, fácil de ser realizado, possui um baixo custo e um resultado rápido, além de ser capaz de verificar o efeito citogenotóxico de diferentes substâncias, avaliando as instabilidades genéticas através da observação da formação de micronúcleos (MN) na interfase do ciclo celular, ou seja, este teste é usado rotineiramente *in vitro* e *in vivo* para detectar a atividade de substâncias químicas com efeitos clastogênicos que induzem fragmentos cromossômicos ou aneugênicos que interferem no aparato mitótico e levam à falta de segregação de cromátides ou cromossomos inteiros durante a mitose (Figura 05) (BEIRUTHY; KAZAN, 2016; FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Figura 05: Formação de micronúcleo.



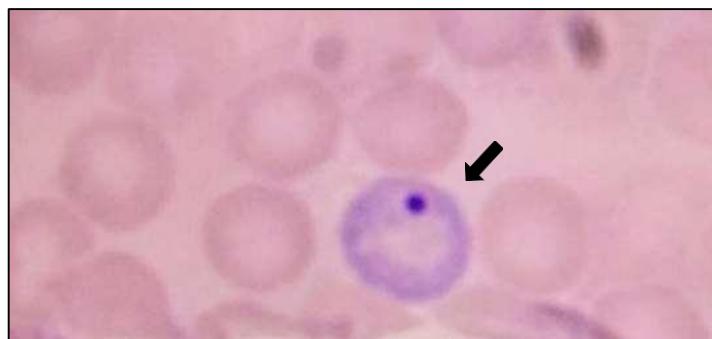
Fonte: Adaptado de Da Silva et al., 2011.

O MN é uma massa de cromatina extracelular envolvida por um envelope nuclear originada de fragmentos cromossômicos ou de cromossomos inteiros, que se perderam durante o processo de divisão celular. Sendo assim, efeitos de substâncias que provoquem danos no DNA, podem ser detectados a partir da formação de MN, pois a formação espontânea do mesmo é baixa e quase uniforme entre as espécies. (MENEGUETTI, et al., 2011; HINTZSCHE, et al., 2017).

O teste de micronúcleo apresenta as seguintes características básicas: o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos (EPC), que são células anucleadas jovens, estes eritrócitos têm um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele apresente (eritrócito policromático micronucleado - EPCMN - Figura 06) deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente (HAYASHI et al., 1989).

As hemácias nucleadas de animais podem ser usadas para avaliar a genotoxicidade de diferentes xenobióticos usando micronúcleos (FARAG; ALAGAWANY, 2018).

Figura 06: Eritrócito Policromático Micronucleado (EPCMN)



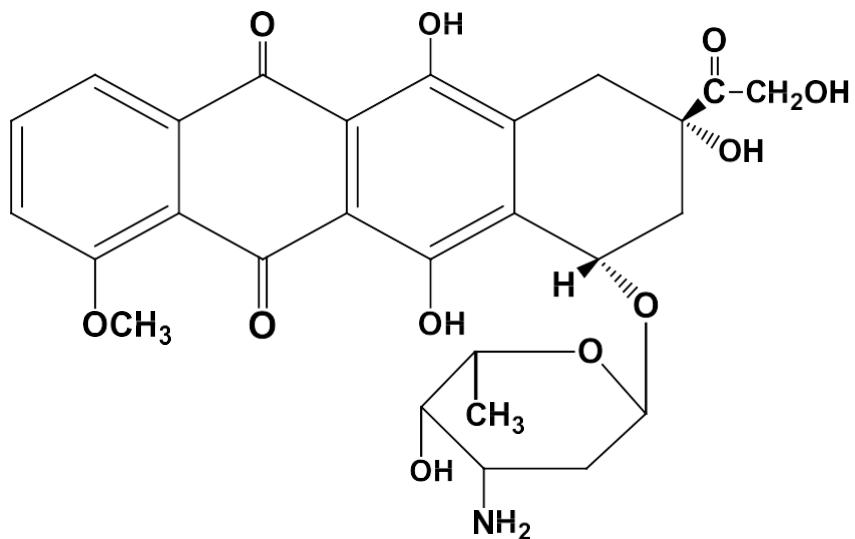
Fonte: Adaptado de Vale, 2018.

1.3.2 Doxorrubicina

Em estudos de genética toxicológica, o uso de agentes indutores de danos no material genético como controle positivo é fundamental e recomendado em diversos protocolos (MACGREGOR et al., 1987). A inclusão desse controle é primordial para validar um teste experimental em modelos *in vivo* ou *in vitro*, além de mostrar o efeito de proteção de uma determinada substância (HERNANDES, et al., 2014).

Neste contexto, a Doxorrubicina ou Doxil® - DXR (Figura 07) é um potente fármaco quimioterápico de primeira linha baseado em antraciclinas, utilizada desde 1969 no tratamento de uma ampla gama de cânceres, incluindo cânceres sólidos e hematogênicos. Esse antibiótico foi descoberto a partir de uma cepa multada de *Streptomyces peucetius* (RENU, et al., 2018; XU, et al., 2018).

Figura 07: Estrutura química da Doxorrubicina.



Fonte: Adaptado de Vale, (2019).

No avanço das pesquisas sobre o câncer, o interesse cresceu na topoisomerase II, após a descoberta de que é alvo de drogas anticâncer ativas, como a DXR (ROCHETTE et al., 2015). Sendo assim, existem diversos mecanismos de ação da DXR, como o envenenamento por topoisomerase II, decorrido da clivagem na fita dupla do DNA, inibindo assim a mesma (YANG, et al., 2014). Além desse mecanismo, a doxorrubicina induz a inibição da síntese de proteínas e replicação de DNA pela capacidade de intercalar-se ao DNA, assim como pela geração de espécies reativas de oxigênio, levando a danos oxidativos no material genético (TOMASINI, 2018).

Apesar de seus efeitos terapêuticos, existem limitações ao seu uso, que vai desde a resistência a droga até efeito de cardiototoxicidade, que é um efeito colateral específico das antraciclinas, além de apresentar uma toxicidade aguda dentro de dois ou três dias após o seu uso e cardiotoxicidade crônica encontrada após várias semanas ou até vários meses após a administração da mesma (RENU, et al., 2018).

Acredita-se que a principal contribuição para o surgimento da cardiotoxicidade é a indução de formação de radicais livres e subsequente o estresse oxidativo, provocando a ativação das vias de sinalização apoptóticas e posteriormente, levando a danos nos cardiomiócitos (YUHONG, et al., 2018).

Atualmente, vários antioxidantes, como vitamina E, N - acetil cisteína e resveratrol, além daqueles provenientes de produtos naturais, foram identificados para desempenhar ações contra os efeitos tóxicos e até mesmo no próprio material genético induzido pela doxorrubicina, de tal modo, a DXR vem sendo bastante utilizado como um agente indutor de danos no material genético para a verificação do efeito protetor de extratos de frutos como “turkey berry” (*solanum torvum*) e romã (*Punica granatum* L.) e até mesmo de_substâncias isoladas (ácido elágico) (HERNANDES, et al., 2014; LU, et al., 2018).

Desta maneira, com provas científicas sobre os danos no DNA provocados pela DXR em modelo *in vivo* (ALVES, et al., 2013; MONTEIRO NETO, et al., 2011; CARNEIRO, et al., 2017), este antitumoral foi utilizado neste estudo como controle positivo para avaliar o potencial efeito antigenotóxico do ácido elágico nanoencapsulado (ZNP-EA), ácido elágico em solução livre (EAS) e nanopartículas em branco com ausencia de ácido elágico (BNZp) em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss.

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial citotóxico, genotóxico, antigenotóxico e histopatológico do ácido elágico nanoencapsulado pelo sistema-teste *in vivo*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar as frequências de eritrócitos policromáticos com micronúcleos em camundongos Swiss tratados com o ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em sua forma livre e Nanopartículas de zeína com ausência do princípio ativo, a fim de se avaliar a citotoxicidade, através do índice de divisão nuclear (IDN).
- Determinar as frequências de eritrócitos policromáticos em camundongos Swiss tratados com o ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas de zeína com ausência do princípio ativo, a fim de se avaliar a genotoxicidade.
- Avaliar as frequências de eritrócitos policromáticos em camundongos Swiss tratados com o ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas de zeína com ausência do princípio ativo e associadas com Doxorrubicina(DXR) para determinar a possível antigenotoxicidade.
- Avaliar as características anatomo-patológicas do fígado, baço, coração e rins dos animais submetidos aos tratamentos com ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas de zeína com ausência do princípio ativo.

3 MATERIAL E MÉTODO(S)

3.1 OBTENÇÃO DO ÁCIDO ELÁGICO NANOENCAPSULADO

A zeina e o ácido elágico (EA) foram adquiridos da Sigma-Aldrich® (St. Louis, MO, EUA). Todos os outros reagentes foram de grau analítico e utilizados como recebidos. A manipulação e a formulação das nanopartículas foram realizadas no Laboratório de Controle de Qualidade, Bromatologia e Microbiologia da Universidade Federal do Amapá – UNIFAP.

3.1.1 Preparação do ácido elágico nanoencapsulado

As nanopartículas foram obtidas por nanoprecipitação, de acordo com o método descrito anteriormente, utilizando a proteína zeína como transportadora e EA a 288 µg / ml. Resumidamente, A zeina foi dissolvida em etanol, que foi posteriormente diluído com água ultrapura. Separadamente, uma solução metanólica de EA foi preparada e adicionada gota a gota sob agitação constante, resultando no carregamento e formação de nanopartículas (EAZNp). Nanopartículas de zeína em branco (BZNp) foram preparadas da mesma maneira, exceto pela ausência de fármaco, e usadas como controle. Uma solução de EA preparada da mesma maneira, exceto pela ausência de zeína, foi usada para comparar o efeito da nanoencapsulação nas atividades biológicas da EA.

O tamanho, o índice de polidispersividade (pdl), o potencial zeta e o pH das nanopartículas foram: EAZNp (568,6 nm, 0,218, + 36,1mV e 4,7) e BZNp (313,9 nm, 0,151, +33,0 mV e 5,7), determinados usando uma luz dinâmica analisador de espalhamento (DLS) (Zetasizer® Nano-ZS90, Malvern Instruments).

Nanopartículas carregadas com ácido elágico (EAZNp) e a solução correspondente (EASol) foram administradas em um volume de 288 ml. Para obter a dose de 5,3 µg / kg, nanopartículas e solução recém-preparadas foram diluídas em água purificada.

3.2 AGENTE QUÍMICO INDUTOR DE DANOS NO DNA

O quimioterápico doxorrubicina (DXR) (Rubidox® Smartfarma Ltda., São Paulo, SP) foi utilizado como indutor de danos ao DNA em células de sangue periférico (controle positivo). O

indutor foi dissolvido em água destilada e administrada intraperitonealmente (0,3 mL/animal). A concentração de DXR (15 mg/kg peso corpóreo, p.c.) foi estabelecida de acordo com a literatura (FRANKE et al., 2005; VENKATESH et al., 2007).

3.3 OBTENÇÃO E MANUTENÇÃO DOS ANIMAIS

Foram utilizados camundongos machos Swiss com 6 – 7 semanas de vida e aproximadamente 25 ± 5 g de peso corpóreo (p.c.) (Figura 10), provenientes do Biotério do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área da Ciência de Animais de Laboratório (CEMIB) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A pesquisa foi conduzida de acordo com os protocolos aceitos internacionalmente para o uso e cuidado de animais de laboratório. Os mesmos foram mantidos em caixas plásticas em uma sala experimental, sob condições controladas de temperatura ($23 + 2$ °C), umidade ($50 + 10\%$), 12 horas de ciclo claro-escuro, com acesso *ad libitum* a ração e água. Os protocolos de tratamentos realizados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da UNIFAP (Protocolo 028/2018) (Anexo 02).

Figura 8: Camundongos Swiss (macho) com 6 - 7 semanas



Fonte: Adaptado de Vale, 2019.

3.4 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos aleatoriamente em oito grupos (Tabela 01 e 02), contendo

cinco camundongos em cada grupo de tratamento (Figura 9, A - B). As concentrações utilizadas do ácido elágico nanoencapsulado (5,3 mg / kg / p.c., - Figura 10 - A), do ácido elágico em solução livre (5,3 mg / kg /p. c., - Figura 12 - B) e da nanoparticula em branco (5,3 mg / kg /p. c., - Figura 10 - C) foram determinadas com base a um estudo anterior onde realizamos a avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade do ácido elágico isolado na concentração de 5,3mg / kg / p.c do qual foi utilizado o Guia para a Condução de Estudos Não Clínicos de Toxicologia e Segurança Farmacológica Necessários ao Desenvolvimento de Medicamentos da ANVISA de 2013 e de trabalhos da literatura, administradas por gavagem (0,5 mL) durante 21 dias consecutivos, com intervalos de 24 horas, a administração da doxorrubicia (15 mg / Kg p.c.) foi feita com uma injeção intraperitoneal (i.p.) e posteriormente foi feito a coleta das amostras.

Figura 9: Acondicionamento dos camundongos Swiss por grupo de tratamento - A e B



Fonte: Adaptado de Vale, 2019.

Figura 10: Concentrações do Ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) - (A) e concentrações do ácido elágico - (B).



Fonte: Autor, 2019 (imagem própria).

Tabela 01 - Grupos experimentais e protocolos de tratamentos para teste do micronúcleo para genotoxicidade utilizando o ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) (21 dias de tratamento).

Tratamento	Grupo ^a	Doses
Água (Controle Negativo)	1 ^a	-
ZNP-EA	2 ^a	5,3 mg / kg
EAS	3 ^a	5,3 mg / kg
BNZp	4 ^a	5,3 mg / kg
DXR (Controle Positivo)	5 ^a	15 mg/kg p.c
ZNP-EA + DXR	6 ^a	Como em (2) e (5)
EAS + DXR	7 ^a	Como em (3) e (5)
BNZp + DXR	8 ^a	Como em (4) e (5)

^a Cada grupo de tratamento apresenta 5 animais. ZNP-EA: ácido elágico nanoencapsulado; EAS: ácido elágico em solução livre; BNZp: Nanopartículas em branco (Zeína); DXR: doxorrubicina.

Tabela 02 - Grupos experimentais e protocolos de tratamentos para teste do micronúcleo para antigenotoxicidade utilizando o ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) (21 dias de tratamento).

Tratamento	Grupo ^a	Doses
Água (Controle Negativo)	1 ^a	-
ZNP-EA	2 ^a	5,3 mg / kg
EAS	3 ^a	5,3 mg / kg
BNZp	4 ^a	5,3 mg / kg
DXR (Controle Positivo)	5 ^a	15 mg/kg p.c
ZNP-EA + DXR	6 ^a	Como em (2) e (5)
EAS + DXR	7 ^a	Como em (3) e (5)
BNZp + DXR	8 ^a	Como em (4) e (5)

^a Cada grupo de tratamento apresenta 5 animais. ZNP-EA:ácido elágico nanoencapsulado; EAS: ácido elágico em solução livre; BNZp: Nanopartículas de zeína (branco); DXR: doxorrubicina.

Os animais foram pesados diariamente antes da realização da gavage, com o objetivo de avaliar possíveis alterações na massa corpórea decorrente do tratamento. Durante o período de tratamento, foram realizadas coletas da veia caudal (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) para o teste do micronúcleos. Posteriormente, os camundongos foram eutanasiados através de câmara de gás (CO₂) com fluxo contínuo, para a coleta dos órgãos de interesse (fígado, baço, coração e rins), os mesmos foram pesados em balança de alta precisão e avaliados macroscopicamente. Em seguida, os órgãos foram armazenados em tubos coletores, devidamente identificados, contendo solução de formaldeído a 10% tamponado, mantendo assim, a conservação dos espécimes até a realização das análises histopatológica feitas no Centro Universitário Unichristus.

3.5 PARÂMETROS AVALIADOS

3.5.1 Massa corpórea

A mensuração da massa corpórea dos animais foi realizada desde o primeiro dia do experimento, pesados diariamente para avaliar a variação do peso (ganho ou perda de massa corpórea).

3.5.2 Teste do micronúcleo

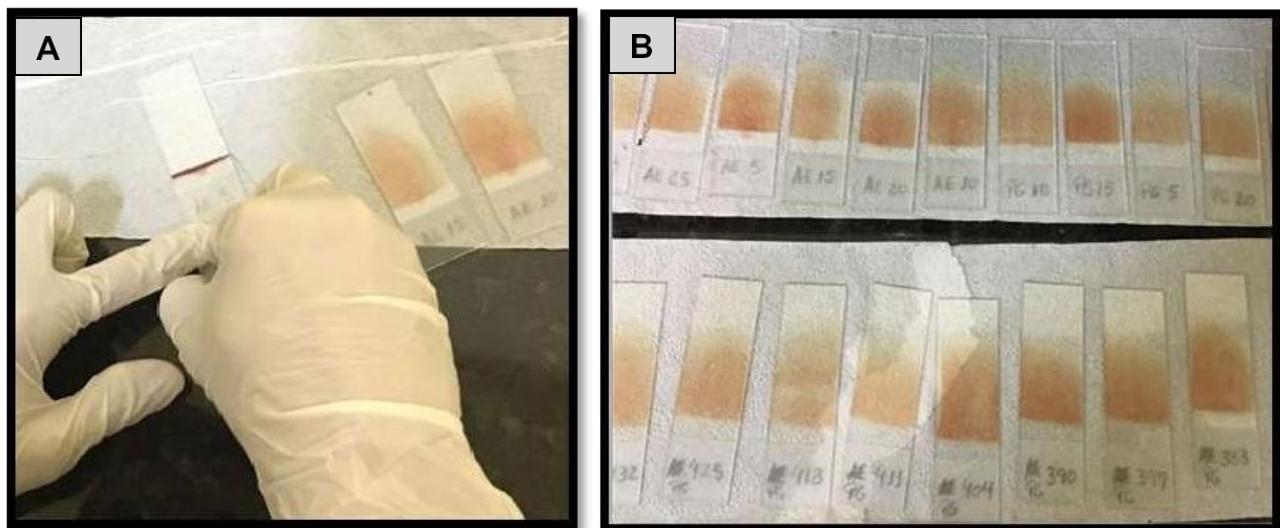
Para obtenção de Eritrócitos Policromáticos Micronucleados (EPCMN) em amostras de sangue periférico de camundongos Swiss, foi realizado segundo o método descrito por MacGregor, Wehr e Gould (1980), com modificações. As amostras de sangue periférico de todos os grupos tratados foram coletadas da veia caudal após 24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias de tratamentos (ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) para a observação do processo genotóxico.

Para a avaliação antigenotóxico, imediatamente após a administração do ZNP-EA, EAS e BNZp, no 20º dia de tratamento, os animais foram tratados com uma injeção intraperitoneal (i.p.) de DXR (0,3 mL / 25 g / p.c.) e posteriormente foi feito a coleta das amostras nos seguintes períodos (24 e 48 horas).

Foram consideradas as seguintes etapas para a realização do teste de micronúcleo: A ponta das caudas dos animais foi cortada e uma gota de sangue foi gotejada e arrastada

(esfregaços sanguíneos) sobre lâminas limpas, que foram deixadas à temperatura ambiente (Figura 11 - A e B).

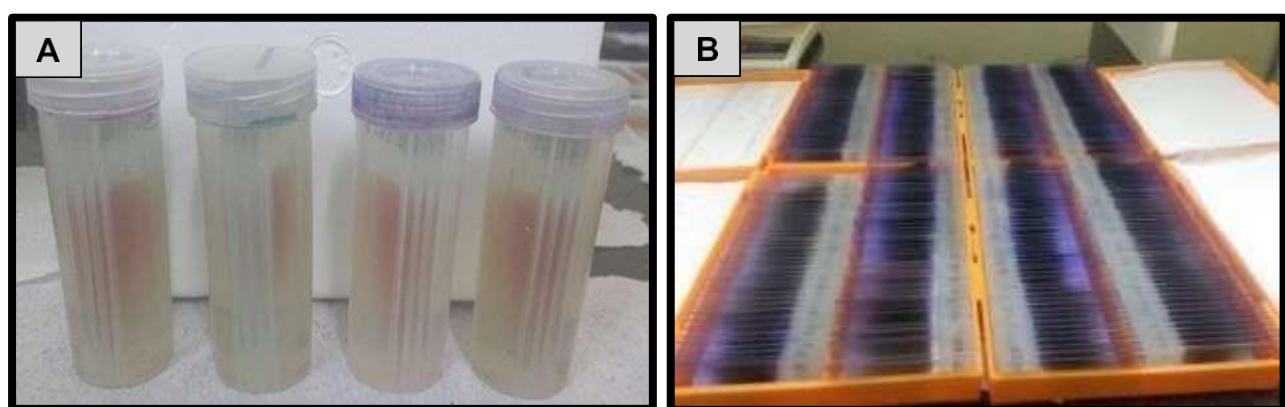
Figura 11: Esfregaço sanguíneo (A) e secagem das lâminas à temperatura ambiente (B)



Fonte: Adaptado de Vale, 2019.

Imediatamente após a secagem, foram fixados em álcool metílico PA por 5 minutos (Figura 12 - A) e novamente secos à temperatura ambiente; Após 24 horas, as lâminas foram coradas com corante Giemsa diluído (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009) por 20 minutos; Em seguida, as lâminas foram lavadas para remover o excesso de corantes e secas à temperatura ambiente; Após secagem, foram armazenadas (Figura 12 – B) e lidas em microscópio óptico (Opton TIM-2008) na objetiva de imersão (100x).

Figura 12: Fixação das amostras com metanol - (A); Lâminas coradas com Giemsa prontas para análises - (B).



Fonte: Adaptado de Vale, 2019.

3.5.3 Análise das lâminas

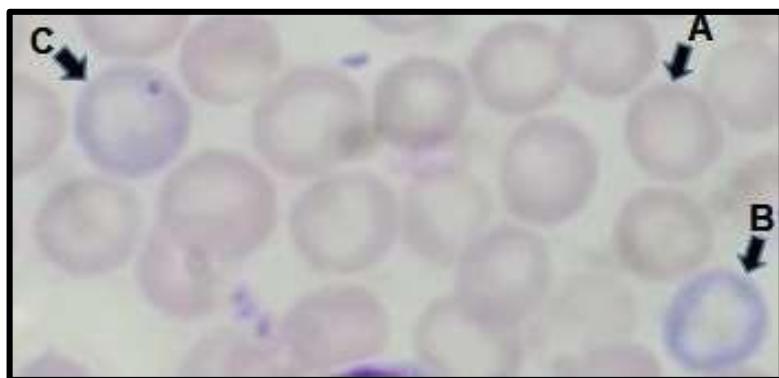
As lâminas de todos os animais (grupo tratados, controle negativo e positivo) foram codificadas e analisadas dentro de um curto espaço de tempo, por teste cego, de modo a eliminar erros de análise. A análise foi feita por mais de um observador, e seguiu um sistema balanceado, isto é, o número igual de células foi analisado em lâminas diferentes, em cada animal do estudo, por cada observador. O principal resultado do teste foi a frequência de eritrócitos policromáticos (EPC) que contém pelo menos um micronúcleo (frequência de EPCMN) (RIBEIRO et al., 2003).

As lâminas foram, primeiramente analisadas em aumento médio (20 a 40x), para encontrar campos de boa qualidade técnica, onde as células estavam bem espalhadas, não danificadas e coradas apropriadamente. Após a localização deste campo, o observador procedeu a análise das lâminas, usando um aumento de 100x (objetiva de imersão).

Para a determinação da frequência de EPCMN, 2000 EPCs por animal foram analisadas nas amostras de sangue periférico em 24 e 48 horas, 7, 14 e 21 dias, em microscópio de luz sob imersão (Figura 13). Um total de 400 eritrócitos por animal foi analisado para calcular o índice de divisão nuclear – IDN em cada amostra de sangue periférico a fim de determinar a citotoxicidade dos tratamentos (MERSCH-SUNDERMANN et al., 2004).

$$IDN = \frac{EPC}{EPC + ENC}$$

Figura 13: Eritrócitos Normocromáticos - ENC - (A); Eritrócitos Policromáticos - EPC - (B); Eritrócitos Policromáticos Micronucleados - EPCMN - (C)



Fonte: Adaptado de Vale, 2019.

A porcentagem de redução na frequência de EPCMN foi calculada de acordo com Waters et al. (1990), como descrito a seguir:

$$\% \text{ Redução} = \frac{A - B}{A - C} \times 100$$

Onde A foi o grupo tratado com DXR (Controle Positivo), B o grupo tratado com ZNP-EA ou EAS ou BNZp + DXR e o C foi o grupo tratado com água (Controle Negativo).

3.5.4 Análise macroscópica, peso relativo e microscópico dos órgãos.

3.5.4.1 Análise macroscópica e peso relativo dos órgãos

Para a avaliação macroscópica dos órgãos, foram analisados sinais de lesões, tamanho e mudanças de cor dos seguintes espécimes (fígado, baço, coração e rins). Os órgãos foram pesados para calcular a massa relativa (MR) individualmente, utilizando a seguinte equação:

$$MR = \frac{\text{massa do órgão} \times 100}{\text{massa do animal}}$$

3.5.4.2 Análise microscópica dos órgãos

Após serem pesados, os órgãos retirados dos animais no dia do sacrifício foram armazenados em solução de formol 10% dissolvido em tampão fosfatado (Figura 16). Posteriormente, os mesmos foram lavados em água corrente e armazenados em álcool 70%. Em seguida, as peças foram seccionadas, colocadas em cassetes e encaminhadas para processamento histotécnico automatizado. Cortes de 4 µm de espessura foram feitos para confecção de lâminas coradas por Hematoxilina - Eosina e montadas em bálsamo de Canadá (JUNQUEIRA, JUNQUEIRA, 1983) para análise em microscópio de luz convencional quanto à presença de alterações específicas de cada órgão.

3.5.4.2.1 Fígado

As lâminas referentes ao tecido hepático foram avaliadas por meio de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS

et al., 2007; adaptado de BARBIERI et al., 2010):

- a) Infiltração de células inflamatórias;
- b) Tumefação celular e/ou vacuolização citoplasmática de hepatócitos;
- c) Hiperplasia de células de Kupffer;
- d) Degeneração balonizante dos hepatócitos;
- e) Congestão vascular portal e da veia centrolobular;
- f) Hemorragia sinusoidal;
- g) Fibrose;
- h) Necrose de hepatócitos;
- i) Esteatose microvesicular (>5%) em hepatócitos;
- j) Esteatose macrovesicular (>5%) em hepatócitos.

3.5.4.2.2 Baço

Para análise de toxicidade do baço, foram analisadas a presença e/ou ausência dos seguintes parâmetros:

- a) Folículos bem formados e preservados;
- b) Congestão e hemorragia da polpa vermelha;
- c) Presença de pigmentos de hemossiderina;
- d) Hematopoiese extramedular;
- e) Atrofia esplênica
- f) Hiperplasia da polpa branca;
- g) Presença de fibrose.

3.5.4.2.3 Coração

Para análise de toxicidade do coração, foram analisadas a presença e/ou ausência dos seguintes parâmetros:

- a) Fibras longitudinais;
- b) Fibras transversais;
- c) Focos inflamatórios;
- d) Fenótipo do infiltrado inflamatório;
- e) Hemorragia;

- f) Pigmentos de hemossiderina e/ou lipofuscina.

3.5.4.2.4 Rins

Já para as lâminas referentes ao tecido renal, também foram utilizados os mesmos parâmetros de presença e/ou ausência, para cada uma das seguintes alterações consideradas (adaptado de VASCONCELOS et al., 2007; adaptado de BARBIERI et al., 2010):

- a) Preservação da estrutura glomerular;
- b) Tumefação do epitélio tubular;
- c) Congestão glomerular e intersticial;
- d) Vacuolização isomérica do epitélio tubular;
- e) Células inflamatórias intersticiais;
- f) Presença de cilindro-hialino;
- g) Presença de fibrose;
- h) Necrose nefrotóxica;
- i) Hemorragia tubular e intersticial.

3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos nas diversas análises estão expressos por média ± desvio padrão da média de cada grupo experimental. Para comparar os dados dos grupos avaliados, aplicou-se a análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, com significância de 5% ($p < 0.05$). Foram analisados pelo pacote estatístico GraphPad Prism® (versão 7).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ÁCIDO ELÁGICO NANOENCAPSULADO, ÁCIDO ELÁGICO EM SOLUÇÃO LIVRE E NANOPARTÍCULAS EM BRANCO

4.1.1 Massa corpórea dos animais

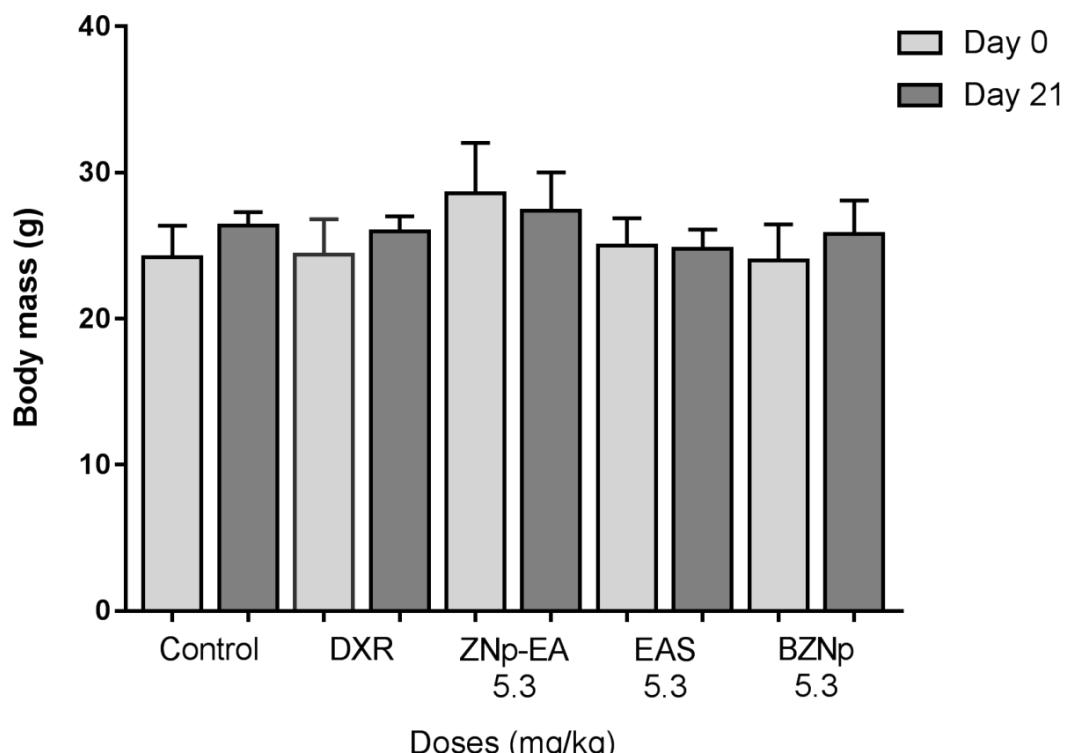
A análise do peso corpóreo tem sido um dos critérios de suma importância empregada em estudos toxicológicos de diferentes substâncias, isto se dá pelo fato de que qualquer alteração nesse parâmetro pode ditar um possível efeito tóxico do composto testado (HERNANDES, et al., 2014). Neste sentido, a análise da massa corpórea neste estudo, foi realizada diariamente para verificar possíveis alterações de peso (ganho ou perda de massa corpórea) em camundongos tratados com diferente soluções contendo ZNP-EA, EAS e BNZp na concentração de 5,3 mg / kg, p.c.

Neste contexto, levando em consideração que a ingestão diária humana estimada de AE é de 940 µg / dia para uma pessoa de 70 kg ou 13,4 µg / kg de peso corporal / dia (ALLEN, et al., 2003). As doses usadas neste estudo devem ser consideradas mais na faixa de um agente quimioterápico e da composição em produtos naturais, neste sentido, podemos pressupor que a utilização desta substância, com base neste estudo, é considerada seguro para o uso, principalmente de alguns produtos naturais que possuem em sua constituição o AE, não alterando assim o peso corpóreo dos animais.

Neste estudo, a mensuração da massa corpórea dos animais foram realizadas desde o primeiro dia do experimento, sendo pesados diariamente para avaliar a variação do peso (ganho ou perda de massa corpórea) ao longo dos 21 dias de tratamento com o ZNP-EA ou EAS ou BNZp na concentração de 5,3 mg / kg, p.c. cada.

A Figura 14, demonstra a massa corpórea média dos animais tratados com diferentes concentrações do ZNP-EA, EAS ou BNZp no início (A) e no fim (B) do experimento. Verificamos a ausência de alterações significativas na massa corporal dos animais submetidos à dose de 5,3 mg / Kg ($p>0,05$) nos grupos ZNP-EA e EAS. Em vista disso, o ZNP-EA e o EAS não alteram diretamente o peso corporal *in vivo* em doses tão altas quanto 5,3 mg / Kg administradas oralmente, endossando a segurança desta droga sob as condições experimentais utilizadas.

Figura 14: Massa corpórea média dos animais tratados com diferentes concentrações do ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanoparticulas em branco (zeína) durante 21 dias, sobre a Massa Inicial - (A) e Massa Final - (B). Os valores foram expressos como Média ± Desvio padrão. Não houve diferença estatística significativa entre os grupos avaliados em comparação com o grupo controle (ANOVA e Teste de Tukey). DXR: Doxorrubicina.



De acordo com Teel e Castonguay (1992), o ácido elágico é absorvido rapidamente pelo sistema gastrointestinal (15 minutos) após a administração oral do mesmo. Desta forma, as concentrações do ácido elágico foram administradas em intervalos de 24 horas, garantindo uma absorção adequada neste estudo. Além disso, nossos resultados corroboram com o estudo realizado por Berni et al. (2012), não evidenciando qualquer alteração na massa corpórea de ratos tratados com ácido elágico (50 e 100 mg/kg p.c., administrados por gavage) durante cinco dias. Berni et al. (2012), não evidenciou qualquer alteração na massa corpórea de ratos tratados com ácido elágico (50 e 100 mg/kg p.c., administrados por gavage) durante cinco dias.

4.1.2 Teste de micronúcleo

4.1.2.1 Genotoxicidade e antigenotoxicidade do ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco

O teste de micronúcleo é usado como um índice para avaliar a toxicidade genética em diferentes células após processamento (ZENG, et al., 2019), desta forma, o micronúcleo é

considerado um biomarcador sensível, capaz de avaliar a exposição a diversas substâncias potencialmente genotóxicas (BEIRUTHY; KAZAN, 2016), além de possuir diversas vantagens em comparação a outros testes usados para diagnosticar doenças e monitorar contaminantes ambientais (MACGREGOR et al., 1987).

Segundo o protocolo estabelecido por Macgregor et al. (1987), as doses, as vias e o período de amostragem, são fatores relevantes na avaliação da genotoxicidade. Neste contexto Vale, (2019) realizou um estudo avaliando o potencial genotóxico e antigenotóxico do ácido elágico na sua forma isolada. As doses e o período de amostragem utilizadas nesse estudo (87,5, 175, 350 e 700 mg/kg p.c.) foram elegidas de acordo com o protocolo de longa duração (estudos de administração múltipla) do *Guideline* da ANVISA (2013) para estudo da genotoxicidade, na qual é selecionado três níveis de doses, sendo que a dose máxima tolerada é de 1000 mg/ kg para estudos de 14 dias ou mais. Em seu estudo a concentração de 5,3 apresentou um resultado significativo de antigenotoxicidade. Em razão deste resultado positivo que o ácido elágico proporcionou na sua forma isolada resolvemos testar o mesmo ácido elágico porém nanoencapsulado e comparamos com o ácido elágico em solução livre(isolado).

Seguindo este protocolo, a administração do ZNP-EA, EAS e BNZp nos grupos de tratamentos, além do controle negativo, foram realizadas por via oral, com o objetivo de mimetizar a rota de administração com a forma popular do uso do ácido elágico, valorizando assim a via utilizada pela população. A partir do ensaio de genotoxicidade, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) na freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos entre os grupos que receberam tratamento com ZNP-EA, EAS e BNZp e o grupo controle negativo (Tabela 03), demonstrando ausência total de genotoxicidade.

Tabela 03: Média e desvio padrão das frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMNs) em sangue periférico de camundongos Swiss (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) de animais tratados com a mesma concentração de ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeina) e seus respectivos controles.

Tratamento (mg/kg p.c.)	PCEMN s média ± DP				
	24 Horas	48 Horas	7 Dias	14 Dias	21 Dias
Controle	3.6 ± 0.54	3.6 ± 0.54	3.4 ± 1.14	3.6 ± 0.54	3.6 ± 0.89
BZNp	5.4 ± 1.14	5.0 ± 0.70	5.0 ± 0.70	5.2 ± 0.83	4.4 ± 1.34
EAS	3.8 ± 1.09	4.4 ± 0.89	5.2 ± 1.78	5.2 ± 0.44	5.4 ± 1.51
ZNP-EA	5.4 ± 0.89	4.8 ± 0.83	5.2 ± 0.44	3.8 ± 1.30	5.6 ± 1.14
DXR	-	-	-	-	35 ± 1.00

Os valores foram expressos como Média ± Desvio padrão (n=5/grupo). Não houve diferença estatística

significativa entre os grupos com ácido elágico nanoencapsulado (ZNP-EA), ácido elágico em solução livre (EAS) e nanopartículas em branco (zeína)(BNZp) em comparação com o grupo controle ($p>0,05$) (ANOVA e Teste de Tukey). EPCMNs: frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados; DP: Desvio padrão.

Estes resultados corroboram com os estudos realizados por Grossi, et al. (2014), que verificaram que o AE (50 e 100 mg / kg p.c.) isoladamente não teve efeito sobre MNPCEs, PCEs / NCEs e% PCEs, durante cinco dias de tratamento, em comparação com o controle. Neste estudo, o teste do micronúcleo não evidenciou aumento na freqüência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, afirmando que o ZNP-EA e EAS não possuem efeito genotóxico nas condições empregadas.

A DXR é considerada uma valiosa droga anticâncer eficaz para o tratamento de uma ampla gama de cânceres, porém, seu uso pode causar toxicidade em múltiplos órgãos. Embora vários mecanismos tenham sido sugeridos, tais como, a intercalação em DNA nuclear e mitocondrial e a inibição da enzima topoisomerase II, o papel do estresse oxidativo continua sendo o mecanismo mais provável para os efeitos adversos da doxorrubicina, provocando danos no material genético e na estrutura celular, podendo levar a morte da mesma (PUGAZHENDHI, et al., 2018; RENU, et al., 2018).

Neste estudo, a DXR foi utilizada para induzir danos no material genético em células de sangue periférico de camundongos Swiss pela via intraperitoneal, uma vez que já está comprovado que esta via provoca danos no DNA (CARNEIRO, et al., 2017). Como esperado, o grupo tratado com DXR induziu a uma elevação significativa na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticas em relação ao controle negativo, demonstrando um potencial efeito genotóxico na concentração de 15 mg / kg, p. c. (Figura 18), resultado que corroboram com diferentes estudos que identificaram a indução de danos no DNA provocados pela DXR em células de sangue periférico de camundongos Swiss nesta concentração (MONTEIRO NETO, et al., 2011; ALVES, et al., 2013)

Diferentes fatores contribuem para a avaliação da genotoxicidade e antigenotoxicidade, incluindo a dose, a via e o período de amostragem, desta forma, as doses utilizadas neste estudo foram elegidas com base em um estudo anterior onde Vale, (2019) constatou que o ácido elágico isolado na dose de 5,3 mostrou resultados significativos de antigenotoxicidade (KILIC; YEŞİLOĞLU; BAYRAK, 2014; VARSHNEY; VIJAYAN; MESHRAM, 2015; FIRDAUS, et al., 2018).

Além disso, a administração do ácido elágico foi realizada por via oral, visto que essa substância está presente em diferentes produtos naturais, incluindo a romã (DALVI, 2014; GONZÁLEZ-SARRÍAS, et al., 2015; MORAES, 2017), sendo esta via, utilizada rotineiramente pela população para o consumo desses produtos naturais, desta forma, tentamos valorizar a maneira que a sociedade utiliza estes produtos e seus metabólitos secundários. Entretanto, a

DXR foi administrada pela via intraperitoneal, já que os efeitos de provocar danos no DNA por esta via já são comprovados.

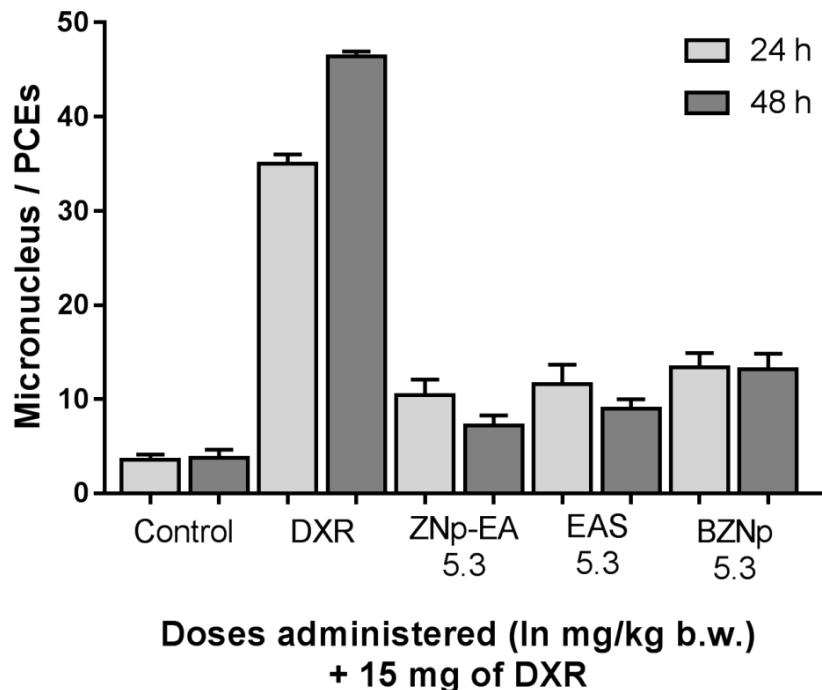
A partir do ensaio de genotoxicidade, o tratamento com ZNP-EA, EAS e BNZp administrados por gavagem por 21 dias consecutivos, intervalos de 24 horas não mostrou diferença significativa ($p > 0,05$) na freqüência de micronúcleos em relação ao controle negativo em diferentes períodos (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias), demonstrando ausência de genotoxicidade (Tabela 03).

Diversos mecanismos são sugeridos para a ação da DXR, como a inibição da síntese de proteínas e replicação de DNA pela capacidade de intercalar-se ao DNA, porém, o estresse oxidativo é o principal mecanismo dessa substância, produzindo danos oxidativos no material genético (TOMASINI, 2018).

Desta forma, analisando o grupo tratado com DXR (Figura 15), observamos uma elevação significativa em diferentes períodos (24 e 48 horas) na frequência de micronúcleos em células policromáticas de sangue periférico em relação ao grupo controle negativo, demonstrando um potencial efeito genotóxico desta substância. Estes resultados corroboram com o estudo realizado por Carneiro, et al. (2017), que evidenciou danos no DNA provocados pela doxorrubicia em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss utilizando a concentração de 15 mg / kg p.c.

No entanto, quando o ZNP-EA e o EAS foram associados com DXR, houve uma redução significativa na frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos, demonstrando um efeito antigenotóxico potente do ZNP-EA, com uma taxa de redução de 78,34% em 24 horas e 92,01% em 48 horas, e o EAS com 74,52% em 24 horas e 87,11% em 48 horas (Figura 15), quando comparado ao controle positivo (DXR). A concentração de 5,3 mg / Kg do ZNP-EA foi capaz de reduzir o efeito genotóxico da DXR no mesmo nível do grupo não tratado após 48 horas.

Figura 15: Frequências de eritrócitos policromáticos micronucleados (EPCMN) tratados com as mesmas concentrações de ácido elágico nanoencapsulado + DXR (24 e 48 horas); ácido elágico em solução livre + DXR e nanopartículas em branco (zeína) + DXR e seus respectivos controles. Os valores foram expressos como Média \pm Desvio padrão. Houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados com o grupo DXR em comparação aos grupos de tratamento (ANOVA e Teste de Tukey). EPCs: Eritrócitos policromáticos; DXR: Doxorrubicia.



Esses resultados corroboram com os estudos feitos por Vale et.al.(2019) onde demonstraram que o ácido elágico isolado na concentração de 5,3 foi capaz de apresentar uma taxa de redução de micronúcleos de 77,07% em 24 horas e 89,02% em 48horas comparados ao grupo controle positivo,concluindo que o mesmo possui atividade antigenotóxica.

Tavares, et al., 2018, realizaram um estudo com o objetivo de avaliar atividade antimicrobiana e antioxidante, onde constatou que o ácido elágico foi capaz de apresentar atividade antioxidante significativa .

Diversos estudos relatam os efeitos protetores do AE contra esses danos oxidativos no organismo, esses efeitos estão associados diretamente com a atividade antioxidante do mesmo. Sudheer, et al. (2007) verificaram um aumento na freqüência de micronúcleos em linfócitos tratados com nicotina, porém, o mesmo estudo, demonstrou que o tratamento simultâneo com ácido elágico reduziu significativamente a frequência micronúcleo, desempenhando assim um efeito protetor contra a toxicidade da nicotina.

No estudo realizado por Varshney; Vijayan; Meshram (2015), houve uma redução no número médio de eritrócitos policromáticos micronucleados na presença de AE (10 mg / kg de p. c.) no protocolo de co-tratamento do teste de micronúcleo, demonstrando o papel antimutagênico do AE contra a atividade mutagênica do Benzo e do Pireno em sistemas *in vitro* e *in vivo*.

Esses resultados corroboram com nosso estudo, onde demonstramos o potencial efeito antimutagênico do uso de ZNP-EA associado à DXR com redução significativa nas freqüências

de micronúcleos em eritrócitos policromáticos de até 92,01% em 48 horas, quando comparado ao controle positivo.

Um estudo realizado por Kilic, Yeşiloğlu e Bayrak (2014), concluiu que o AE possui uma atividade antioxidante, inibindo 71,2% da peroxidação lipídica. Segundo Firdaus et al. (2018) demonstraram que pré e co-administração do AE em doses de 20 e 40 mg / kg causam uma redução acentuada na produção total de espécies reativas de oxigênio de uma maneira dependente da dose e é considerado um candidato terapêutico promissor contra neurotoxicidade.

Além disso, os fenólicos possuem uma característica de se ligarem ao material genético no local que normalmente ocorreria a reação entre os metabólitos ativos do carcinógeno com o DNA, formando uma ligação carcinógeno – DNA, um passo crucial para o início da carcinogênese (BHATTACHARYA; FIROZI, 1988; DIXIT; GOLD, 1986; KHANDUJA; MAJID, 1993).

Neste caso, o ácido elágico sendo uma lactona fenólica pertencente ao grupo dos taninos hidrolisáveis, poderia se ligar no local que o metabólito ativo do carcinógeno se ligaria ao DNA, ou seja, no local que a doxorrubicina se ligaria com o material genético, diminuindo e/ou evitando os danos provocados ao DNA. Desta forma, o ácido elágico nanoencapsulado torna-se uma substância com grande potencial, desempenhando efeitos protetores, por meio da atividade antioxidante e antigenotóxica, proporcionando uma alternativa na prevenção ao câncer.

4.1.2.2 Índice de divisão nuclear - citotoxicidade do ácido elágico

A citotoxicidade de uma substância, são diretamente proporcionais às suas concentrações, além do tempo de exposição do indivíduo com o mesmo (KUMAR et al., 2009), sendo considerado um indicativo de toxicidade decorrente da inibição do ciclo de maturação dos eritrócitos, podendo está diretamente ligado com a redução significativa neste parâmetro (MACGREGOR, et al., 1987).

No presente estudo, foram analisados 400 EPCs por animal, tendo um total de 2.000 EPCs por grupo de tratamento, para a análise do índice de divisão nuclear (IDN), não foram observadas alterações na proliferação celular, demonstrando ausência de efeito citotóxico em sangue periférico (eritrócitos) utilizando mesma concentração para o ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) (5,3 mg/kg p. c.) ($p>0,05$), por meio dos protocolos de tratamento empregados no referido estudo, Tabela 04. Além disso, o tratamento com doxorrubicina não apresentou redução na relação eritrócitos

policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos comparando com o grupo controle negativo ($p>0,05$).

Tabela 04: Índice de divisão nuclear (IDN) em sangue periférico de animais submetidos as mesmas concentrações de ZNP-EA e/ou DXR; EAS e/ou DXR e BNZp e/ou DXR; e seus respectivos controles (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias) após tratamentos.

Tratamento (mg/kg p.c.)	IDN Média \pm D.P.					
	24 horas	48 Horas	7 Dias	14 Dias	21 Dias	22 Dias
Controle	0.02 \pm 0.44	0.03 \pm 0.02	0.03 \pm 0.004	0.03 \pm 0.007	0.02 \pm 0.44	-
BZNp	0.03 \pm 4,03	0.02 \pm 3.36	0.02 \pm 2.23	0.03 \pm 4.15	0.03 \pm 0.89	-
EAS	0.02 \pm 2.95	0.02 \pm 1.87	0.03 \pm 3.16	0.03 \pm 4.63	0.03 \pm 3.08	-
ZNp-EA	0.02 \pm 2.07	0.04 \pm 3.80	0.02 \pm 5.76	0.02 \pm 1.64	0.03 \pm 3.53	-
DXR	-	-	-	-	0.02 \pm 0.89	0.02 \pm 0.89
BZNp + DXR	-	-	-	-	0.02 \pm 2.70	0.04 \pm 2.12
EAS + DXR	-	-	-	-	0.03 \pm 4.91	0.04 \pm 2.38
ZNp-EA + DXR	-	-	-	-	0.03 \pm 3.36	0.03 \pm 2.82

Valores das médias \pm desvio padrão. 400 eritrócitos foram analisados por animal, sendo um total de 2000 células por grupo de tratamento; Não houve diferenças estatísticas significativas entre os grupos tratados em comparação ao grupo controle. ZNp-EA: Ácido elágico nanoencapsulado; EAS: Ácido elágico em solução livre; BZNp: Nanopartículas em branco (Zeína); DP: Desvio padrão; IDN: Índice de divisão nuclear; DXR: Doxorrubicina.

De tal modo, a peroxidação lipídica é o principal meio de alteração das funções e da estrutura da membrana plasmática de uma célula, resultando geralmente na morte celular (PERCÁRIO, 2010), desta maneira, substâncias que apresentam um potencial efeito citotóxico podem desencadear alterações funcionais e estruturais nestas células. Neste contexto, um fator que pode ter contribuído para tal resultado neste estudo, foram os efeitos antioxidantes que o ácido elágico apresenta contra diferentes substâncias, diminuindo assim, os danos em diferentes células.

4.1.3 Análise macroscópica, peso relativo e microscópica dos órgãos

Considerando os parâmetros cor, textura, tamanho e forma, não foram observadas alterações macroscópicas nos órgãos vitais. Não foi observada nenhuma alteração significativa da massa relativa aos órgãos com o uso de ZNP-EA, EAS e BNZp na concentração de 5,3 mg / kg, p.c. ($p <0,05$) comparado ao grupo controle. Além disso, o grupo tratado com DXR também apresentou um aumento significativo do peso médio do fígado ($p<0.01$) em relação ao grupo controle,

demonstrado

na

Tabela

05.

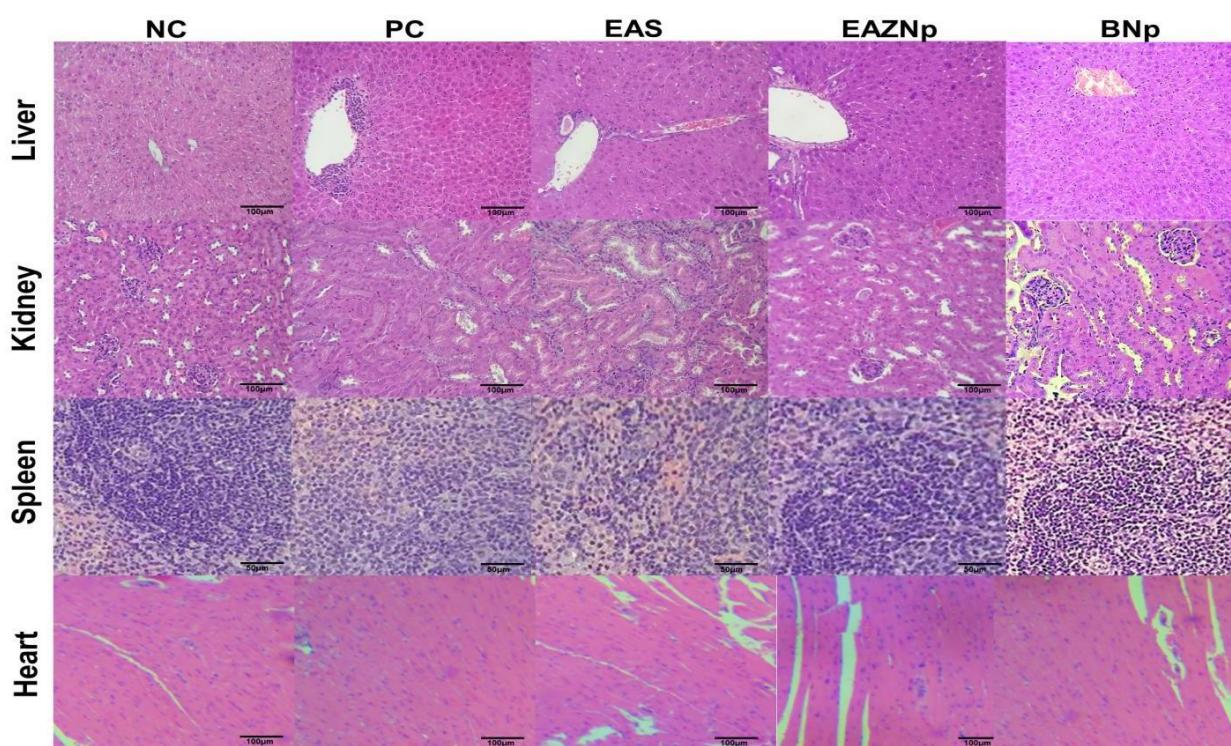
Tabela 05. Efeito do ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (zeína) sobre a massa média dos órgãos dos animais tratados durante 21 dias com as mesmas concentrações.

Tratamento	Dose (mg/kg/dia)	Órgãos (g/100 g de massa corpórea)				
		Fígado	Baço	Coração	Rim Direito	Rim Esquerdo
Controle	-	1.06 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.003	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02
DXR	15	1.11 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.007	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01
BZNp	5.3	1.21 ± 0.13	0.09 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.02
EAS	5.3	1.13 ± 0.19	0.07 ± 0.04	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.06
ZNp-EA	5.3	1.23 ± 0.23	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.02

Os valores foram expressos como média ± desvio padrão. Diferenças significativas entre os valores foram expressas como * ($p<0.05$) e ** ($p<0.01$) em comparação com o grupo controle (negativo) (ANOVA e Teste de Tukey). DXR: Doxorrubicina.

Tendo em vista que não houve variação importante entre os subgrupos, operou-se por descrevermos os resultados em conjuntos. Nos parâmetros histopatológicos, algumas alterações morfológicas ocasionais foram observadas microscopicamente (Figura 16).

FIGURA16: Análises Histopatológicas dos órgãos Coração, Baço, Fígado e Rins dos submetidos a tratamento com as substâncias ácido elágico nanoencapsulado, nanopartículas em branco e ácido elágico em solução livre.



Com relação ao coração nos grupos controle negativo (NC), controle

positivo (PC) e nanopartículas em branco (BNZp) apresentaram ausência de focos inflamatórios ou hemorragia ou de pigmentos de hemossiderina, assim como no grupo tratado com ácido elágico em solução livre (EAS) e no grupo com ácido elágico nanoencapsulado (EA-ZNp). Também foi possível apresentar preservação de fibras longitudinais e transversais nos grupos controle negativo e positivo bem como nos grupos tratados com nanopartículas em branco e o grupo ácido elágico em solução livre. Pode-se observar que no grupo tratado com ácido elágico nanoencapsulado não houve preservação nas fibras longitudinais.

Em relação ao Baço o grupo controle positivo apresentou notável Hiperplasia de polpa branca, bem como no grupo tratado com ácido elágico nanoencapsulado. Discreta congestão de polpa vermelha pôde ser observada em um animal do grupo nanopartículas em branco (zeína) e um animal do grupo ácido elágico em solução livre.

Nas amostras de fígado o grupo controle negativo apresentou ausência de focos inflamatórios ou sinais de esteatose micro/macrovesicular ou necrose/apoptose. No grupo controle positivo pode-se observar discreta tumefação celular dos hepatócitos, além de considerável congestão portal e da veia centrolobular, hiperplasia das células de Kupffer e hemorragia sinusoidal. No grupo nanopartículas em branco (zeína) houve congestão portal e da veia centrolobular, tumefação celular de hepatócitos e hiperplasia das células de Kupffer também podiam ser observadas, além de discreta degeneração hidrópica. No grupo tratado com ácido elágico livre os resultados foram similares com as amostras exibindo congestão portal e da veia centrolobular, tumefação celular de hepatócitos, hiperplasia das células de Kupffer e considerável degeneração hidrópica. No grupo tratado com ácido elágico nanoencapsulado os achados de congestão portal e da veia centrolobular, tumefação de hepatócitos e hiperplasia das células de Kupffer não foram observados apesar de haver discreta degeneração hidrópica.

Com relação aos rins (direito e esquerdo) nos grupos controle negativo, controle positivo e nanopartículas em branco (zeína) não houve tumefação celular ou vacuolização do epitélio tubular, no entanto no grupo controle positivo pôde-se observar tumefação celular e instersticial. No grupo tratado com ácido elágico pode-se observar tumefação celular e do epitélio tubular porém sem vacuolização do mesmo e notável hemorragia tubular e intercial. Ocasionais focos de colindrohialino puderam ser observados no grupo com ácido elágico livre, mas não no nanoencapsulado.

Diversos parâmetros como hematológicos e anatomo-patológicos podem ser utilizados para determinar evidências de toxicidade de diversas substâncias (VIDAL et al., 2003). Neste estudo, não foi verificado nenhuma alteração significativa da massa relativa dos órgãos com o uso do ácido elágico nanoencapsulado, ácido elágico em solução livre e nanopartículas em branco (5,3 mg / kg, p. c.) em comparação ao grupo controle.

Além disso, a ocorrência esporádica de lesões foi observada nos órgãos, tanto nos grupos de controle tratados como nos não tratados. Nesse contexto, o tratamento com o ZNP-EA, EAS e BNZp não induziu lesões graves nos órgãos, enquanto as alterações observadas são decorrentes da baixa toxicidade relacionada ao uso prolongado desta substância.

Assim, a peroxidação lipídica é o principal meio de alterar as funções e estrutura da membrana plasmática de uma célula, geralmente resultando em morte celular (Percario, 2010). Isso pode explicar nossos achados, uma vez que não foram observadas mudanças significativas na apreciação histopatológica, resultando em pouca ou nenhuma toxicidade em comparação com o grupo controle.

Os efeitos antioxidantes que a AE apresenta podem ter causado a diminuição desses danos oxidativos nas células do corpo. Isso pode explicar a baixa toxicidade do ácido elágico nos órgãos. Em resumo, nossos resultados mostraram que o ZNP-EA, EAS e BNZp não é genotóxica e citotóxico. Além disso, apresentou um efeito antigenotóxico substancial, com uma taxa de redução de aproximadamente 92,01%; 87,11% e 77,93% respectivamente em um período de 48 horas e, como tal, poderia ser considerada uma alternativa importante na quimioprevenção de doenças relacionados a danos oxidativos e ao DNA.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos resultados obtidos:

- A análise do efeito do ZNP-EA e EAS sobre a massa corpórea dos animais tratados com a mesma concentração dessas substâncias, não demonstraram quaisquer alterações significativas neste parâmetro, corroborando com resultados já descritos na literatura em que não foram encontrados alterações neste perfil.
- Na avaliação dos efeitos genotóxico e antigenotóxico em eritrócitos policromáticos de camundongos Swiss utilizando o ZNP-EA, EAZ e BNZp não foram evidenciados um aumento na frequência de EPCMN nos grupos tratados com a mesma concentração (24 horas, 48 horas, 7 dias, 14 dias e 21 dias). Entretanto, observou-se uma diminuição dessa frequência de EPCMN utilizando a mesma concentração do ZNP-EA e/ou + DXR (24 e 48 horas). Neste contexto, foi constatado ausência de efeito genotóxico e a presença do efeito antigenotóxico do ZNP-EA, EAS e do BNZp , sendo as mesmas consideradas dose dependente, atuando assim, contra os danos oxidativos produzidos por diversas substâncias, incluindo a doxorrubicina.
- Na análise do Índice de Divisão Nuclear (IDN), os resultados obtidos entre todos os grupos tratados, não foram evidenciados diferenças significativas quanto a proliferação celular, demonstrando ausência de efeito citotóxico.
- Na avaliação das características anatomo-patológicas do fígado, baço, coração e rins dos animais submetidos aos tratamentos com ZNP-EA, EAS, BNZp observaram-se pequenas lesões em alguns órgãos, evidenciando uma fraca toxicidade decorrente da administração constante dessas substâncias, demonstrando que o uso prolongado pode desencadear essas alterações em determinados órgãos (fraca toxicidade). Sugere-se a condução de estudos futuros relacionados à segurança do ZNP-EA, incluindo um estudo crônico do mesmo.

REFERÊNCIAS

ABE, L. T.; LAJOLO, F. M.; GENOVESE, M. I. Potential dietary sources of ellagic acid and other antioxidants among fruits consumed in Brazil: Jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg). **J Sci Food Agric**, 92: 1679-1687, 2012.

ALLEN, C. T.; PEDEN-ADAMS, M. M.; EUDALY, J.; KEIL, D. E. Subchronic Exposure to Ellagic Acid Impairs Cytotoxic T-Cell Function and Suppresses Humoral Immunity in Mice. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 25, n. 3, p. 409-422, 2003.

ALVES, J. M.; MUNARI, C. C.; MONTEIRO NETO, M. A. B.; FURTADO, R. A.; SENEDESE, J. M.; BASTOS, J. K.; TAVARES, D. C. In vivo protective effect of *Copaifera langsdorffii* hydroalcoholic extract on micronuclei induction by doxorubicin. **Journal of Applied Toxicology**, v. 33, n. 8, p. 854-860, 2013.

ANVISA, B. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2. **Anvisa**, Brasília. ALP, H, 970-975, 2013.

AYRTON, A.D.; LEWIS, D.F.V.; WALKER, R.; IOANNIDES, C. Antimutagenicity of ellagic acid towards the food mutagen IQ: investigation into possible mechanisms of action. **Fd Chem. Toxic.**, 30 (4) 289-295, 1992.

BARBIEIRI, D.; WISNIEWSKI, E.; SALETE, M.; WISNIEWSKI, W.; ROMAN, S. S.; CHICOTA, L. C.; CEREZER, S. M.; DALLAGO, R. G. Animal toxicity caused by formaldehyde and complucad® in wistar rats: acute exposure. **Revista Interdisciplinar de Estudos Experimentais**, v. 2, n. 4, p. 114 - 119, 2010.

BASTOS, R. M. DE P. B. Nanotecnologia: Uma revolução no desenvolvimento de novos produtos. **Química Nova**, v. 35, n. 9, p. 1872-1878, 2006.

BEIRUTHY, I. W.; KAZAN, R. S. Étude corrélationnelle sur les facteurs prédictifs de la pratique du test de dépistage du cancer du col utérin chez les femmes fréquentant les centres médico-sociaux à Zahlé (Liban). **Revue Francophone Internationale de Recherche Infirmière**, v. 2, n. 1, p. 31-40, 2016.

BERKBAN, T.; BOONPROM, P.; BUNBUPHA, S.; WELBAT, J. U.; KUKONGVIRIYAPAN, U.; KUKONGVIRIYAPAN, V.; PAKDEECHOTE, P.; PRACHANEY, P. Ellagic Acid prevents L-NAME-induced hypertension via restoration of eNOS and p47phox expression in rats. **Nutrients**, 7: 5265- 5280, 2015.

BERNI, A.; GROSSI, M. R.; PEPE, G.; FILIPPI, S.; MUTHUKUMAR, S.; PAPESCHI, C.; PALITTI, F. Protective effect of ellagic acid (EA) on micronucleus formation induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG) in mammalian cells, in *in vitro* assays and *in vivo*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 746, n. 1, p. 60-65, 2012.

BHATTACHARYA, R. K.; FIROZI, P. F. Effect of plant flavonoids on microsome catalysed reactions of aflatoxin B1 leading to activation and DNA adduct formation. **Cancer Letters**, v. 39, n. 1, p. 85-91, 1988.

BOEHNING, A. L.; ESSIEN, S. A.; UNDERWOOD, E. L.; DASH, P. K.; BOEHNING, D. Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 106, p. 411-418, 2018.

BRAQUEHAIS, I.; VASCONCELOS, F.; RIBEIRO, A.; DA SILVA, A. R. A.; FRANCA, M.; DE LIMA, D. R.; MAGALHÃES, F. Estudo preliminar toxicológico, antibacteriano e fitoquímico do extrato etanólico das folhas de *Jatropha mollissima* (Pohl) Baill. (pinhão-bravo, Euphorbiaceae), coletada no Município de Tauá, Ceará, Nordeste Brasileiro. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, v. 18, n. 2, supl. 1, p. 582-587, 2016.

BRIGGER, I.; DUBERNET, C.; COUVREUR, P. Nanoparticles in cancer therapy and diagnosis. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, n. 5, p. 631-651, 2002.

BURGESS, D. J., E HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications in Encyclopedia of Pharmaceutical Technology. New York, **Marcel Dekker Inc**, pp. 1783- 1794, 2002.

CARNEIRO, A. B.; AURÉLIO, P.; SERRÃO, E. J. P.; RIBEIRO, I. F; MAGALHÃES, M. R. G.; MONTEIRO NETO, M. A. B. Efeito da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) na toxicidade da Doxorrubicina: modelo experimental *in vivo*. **Acta Paulista de Enfermagem**, v. 30, p. 233- 239, 2017.

CELIK, G.; SEMIZ, A.; KARAKURT, S.; ARSLAN, S.; ADALI, O.; SEN, A. A comparative study for the evaluation of two doses of ellagic acid on hepatic drug metabolizing and antioxidant enzymes in the rat. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 358945, 2013.

COLARES, L. F.; SANTOS NETO, A. R.; CORDEIRO, I. H.; CASTRO, S. B. R. D.; VERLY, M.; ALVES, C. C. D. S.; CARLI, A. D. P. Detection of protease inhibitors in seeds of *Punica granatum*. **Química Nova**, v. 40, n. 3, p. 270-274, 2017.

ÇÖMELEKOĞLU, ÜLKÜ; MAZMANCI, BİRGÜL; ARPACI, ABDULLAH. Investigation on the Liver Functions Agriculturel Workers Chronically Exposed to Pesticides. **Turkish Journal of Biology**, v. 24, n. 3, p. 461-466, 2000.

COUVREUR, P.; DUBERNET, C.; PUISIEUX, F. Controlled drug delivery with nanoparticles: current possibilities and future trends. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, 41, pp. 2-13, 1995.

COSTA, C. R. Avaliação das atividades angiogênica/antiangiogênica, mutagênica/antimutagênica da fosfoetanolamina. **Dissertação (Mestrado)**. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Programa de Pós-Graduação em Ciências Ambientais e Saúde. Goiânia-GO, 2018.

DAI, J.; MUMPER, R. J. Plant phenolics: extraction, analysis and their antioxidant and anticancer properties. **Molecules**, v. 15, n. 10, p. 7313-7352, 2010.

DALVI L, T. Mecanismos de ação de antioxidantes de origem vegetal: estudo do polifenol ácido elágico e do extrato de caqui (*Diospyros kaki*). **Dissertação de Mestrado**. Brasília: Universidade de Brasília (UnB). Programa de pós-graduação em Nutrição Humana; 2008.

DALVI, L. T. Estudo da capacidade antioxidante do polifenol ácido elágico *in vitro* e em *Saccharomyces cerevisiae* selvagem e deficiente em superóxido dismutase 1. **Tese Doutorado**. Universidade de Brasília. Pós-graduação em Nutrição Humana pela Faculdade de Ciências da Saúde da Universidade de Brasília. BRASÍLIA, 2014.

DA FONSECA, C. A.; PEREIRA, D. G. Aplicação da genética toxicológica em planta com atividade medicinal. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 7/8, p. 51-54, 2013.

DA SILVA, F. C.; DE BRITO BARROS, M. Â.; VIANA, R. R.; ROMÃO, N. F.; DE SOUSA OLIVEIRA, M.; OLIVEIRA MENEGUETTI, D. U. Avaliação de mutagênese provocada por sulfato de ferro através do teste micronúcleo em células da medula óssea de camundongos. **Revista Científica da Faculdade de Educação e Meio Ambiente**, v. 2, n. 1, p. 13-21, 2011.

DIXIT, R.; GOLD, B. Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 83, n. 21, p. 8039-8043, 1986.

DOLL, R.; PETO, R. The causes of cancer: quantitative estimates of avoidable risks of cancer in the United States today. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 66, n. 6, p. 1192-1308, 1981.

ERMOLAEVA, M. A.; SCHUMACHER, B. Systemic DNA damage responses: organismal adaptations to genome instability. **Trends in Genetics**, v. 30, n. 3, p. 95-102, 2014.

FARAG, M. R.; ALAGAWANY, M. Erythrocytes as a biological model for screening of xenobiotics toxicity, **Chemico-Biological Interactions**, v. 279, p. 73-83, 2018.

FIRDAUS, F.; ZAFEER, M. F.; ANIS, E.; AHMAD, M.; AFZAL, M. Ellagic acid attenuates arsenic induced neuro-inflammation and mitochondrial dysfunction associated apoptosis. **Toxicology Reports**, v. 5, p. 411-417, 2018.

FRANKE, S. I. R.; PRÁ, D.; DA SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES; J. A. P. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells *in vivo*. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 583, n. 1, p. 75-84, 2005.

GALANO, A.; MAZZONE, G.; DIDUK, R. A.; MARINO, T.; IDABOY, J. R. A.; RUSSO, N. Food Antioxidants: Chemical Insights at the Molecular Level. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 7, n. 1, p. 335-352, 2016.

GINANI, J. Estudo da ação antioxidante *in vitro* do polifenol ácido elágico. **Dissertação de Mestrado**. Brasília: Universidade de Brasília (UnB). Programa de pós-graduação em Nutrição Humana; 2005.

GONZÁLEZ-SARRÍAS, A.; GARCÍA-VILLALBA, R.; NÚÑEZ-SÁNCHEZ, M. A.; TOMÉ-CARNEIRO, J.; ZAFRILLA, P.; MULERO, J.; FRANCISCO, A.; TOMÁS-BARBERÁN; ESPÍN, J.C. Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 225-235, 2015.

GROSSI, M. R.; BERNI, A.; PEPE, G.; FILIPPI, S.; MESCHINI, R.; PAPESCHI, C.; PALITTI, F. Evaluation of the effects of ellagic acid (EA) on 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene (DMBA) induced micronuclei in mammalian cells *in vitro* and *in vivo*. **Toxicology Letters**, v. 224, n. 2, p. 240-245, 2014.

HAMAKAR, B.R. et al. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. **Cereal Chemical**, v.72, p. 583-588, 1995.

HAWKINS, M.J. et al. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 60, p. 876-885, 2008.

HAYASHI, M.; SUTOU, S.; SHIMADA, H.; SATO, S. SASAKI, Y.F; WAKATA, A. Diference between intraperitoneal and oral gavage application in the micronucleus test. The 3rd collaborative study by CSGMT/JEMS-MMS. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 223, n. 4, p. 329-344, 1989.

HERNANDES, L. C.; AISSA, A. F.; DE ALMEIDA, M. R.; DARIN, J. D. A. C.; RODRIGUES, E.; BATISTA, B. L.; ANTUNES, L. M. G. In vivo assessment of the cytotoxic, genotoxic and antigenotoxic potential of maná-cubiu (*Solanum sessiliflorum* Dunal) fruit. **Food Research International**, v. 62, p. 121-127, 2014.

HINTZSCHE, H.; HEMMANN, U.; POTH, A.; UTESCH, D.; LOTT, J.; STOPPER, H. Fate of micronuclei and micronucleated cells. **Mutation Research/Reviews in Mutation Research**, v. 771, p. 85-98, 2017.

HUETZ, P.; MAVADDAT, N.; MAVRI, J. Reaction between Ellagic Acid and an Ultimate Carcinogen. **J. Chem. Inf. Model.**, 45 (6): 1564-1570, 2005.

ISMAIL, T.; SESTILI, P.; AKHTAR, S. Pomegranate peel and fruit extracts: a review of potential anti-inflammatory and anti-infective effects. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 143, n. 2, p. 397-405, 2012.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; BHANDARI, B.; HE, Y. Nano-particle encapsulation of fish oil by spray drying. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 172-183, 2008.

JUNQUEIRA, L. C. U.; JUNQUEIRA L. M. M. S. **Técnicas Básicas de Citologia e Histologia**. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1983.

KAMPA, M.; NIFLI, A.P.; NOTAS, G.; CASTANAS, E. Polyphenols and cancer cell growth. **Reviews of Physiology, Biochemistry and Pharmacology**, 159, p. 79-113, 2007.

KHANDUJA, K.L.; MAJID, S. Ellagic acid inhibits DNA binding of benzo(a)pyrene activated by different modes. **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, v. 15, n. 1, p. 1-9, 1993.

KILIC, I.; YEŞİLOĞLU, Y.; & BAYRAK, Y. Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. **Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy**, v. 130, p. 447-452, 2014.

KOÇ N. D; MUSLU M. N.; SESAL C.; KAYHAN F.E. Histopathological effects of malathion and endosulfan on blood cells of Wistar albino rats (*Rattus norvegicus*). **Journal of Applied Biological Sciences**, n. 3, p. 105-108, 2008.

KUMAR, M. R.; AITHAL, K.; RAO, B. N.; UDUPA, N.; RAO, B. S. Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1,4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. **Toxicol In Vitro**, v.23, n.2, p.242-250, 2009.

LAI, L. F.; GUO, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011.

LIN, T. et al. The biodegradation of zein in vitro and in vivo and its application in implants. **Pharma Science Technolology**, v.12 , p.172-176, 2011.

LOARCA-PINA, G.; KUZMICKY, P.A.; DE MEJIA, E.G.; KADO, N.Y. Inhibitory effects of ellagic acid on the direct-acting mutagenicity of aflatoxin B1 in the *Salmonella* microsuspension assay. **Mutat. Res.** 398(1-2), 183-187, 1998.

LU, J.; LI, J.; HU, Y.; GUO, Z.; SUN, D.; WANG, P.; WANG, J. Chrysophanol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing cellular PARylation. **Acta Pharmaceutica Sinica B.**, 2018.

LUCIO NETO, M. P. Avaliação tóxica, citotóxica, genotóxica e mutagênica do composto 3- (2-cloro-6-fluorobenzil) – imidazolidina - 2, 4 - diona em células eucariotas. 120 p. **Tese de Doutorado**, Universidade Federal do Piauí, 120 p., 2011.

LUO, Y. et al. Cellular uptake and transport of zein nanoparticles: effects of sodium caseinate. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 61, p. 7621-7629, 2013.

LUO, Y. et al. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. **Carbohydrates and Polymers**, v.82, p.942-951, 2010.

LUO, Y.; TENG, Z.; WANG, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. **Journal Agriculture Food Chemical**, v. 60, p.836-843, 2011.

LUO, Y.; WANG, Q. Zein-based micro- and nano-particles for drug and nutrient delivery: a review. **Journal Appl Polymers Scienc**, v. 131, 2014;

MACGREGOR, J. T.; HEDDLE, J. A.; HITE, M.; MARGOLIN, B. H.; RAMEL, C.; SALAMONE, M. F.; WILD, D. Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research/Genetic Toxicology**, v. 189, n. 2, p. 103-112, 1987.

MACGREGOR, J. T.; WEHR, C. M.; GOULD, D. H. Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 2, n. 4, p. 509-514, 1980.

MANACH C, SCALBERT A, MORAND C, RÉMÉSY C, JIMÉNEZ L. Polyphenols: food sources and bioavailability. **Am J Nutr.**79: 727-47, 2004.

MANSOURIAN, A.; BOOJARPOUR, N.; ASHNAGAR, S.; BEITOLLAHI, J. M.; SHAMSHIRI, A. R. The comparative study of antifungal activity of *Syzygium aromaticum*,

Punica granatum and nystatin on *Candida albicans*; an in vitro study. **Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology**, v. 24, n. 4, p. e163-e168, 2014.

MCCLEAN, S.; PROSSER, E.; MEEHAN, E.; O'MALLEY, D.; CLARKE, N.; RAMTOOLA, Z.; BRAYDEN, D. Binding and uptake of biodegradable poly-DL-lactide micro- and nanoparticles in intestinal epithelia. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 6, n. 2, p. 153-163, 1998.

MENEGUETTI, D. U. O.; SILVA, F. C.; PELLENZ, D. C.; SOUZA, N. C.; RAMOS, L. J. Adaptation of the technical micronucleus in *Allium cepa*, to future analysis of mutagenicity of the rivers of the Vale do Jamari - Rondônia, Brazil. In Congresso Brasileiro da Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese Ambiental, São Paulo, **Anais V- Sub-área: Genotoxicidade de contaminantes ambientais e relação gene- ambiente e saúde** (p. 6), São Pedro – SP, 2011.

MERSCH-SUNDERMANN, V.; KNASMÜLLER, S.; WU, X. J.; DARROUDI, F.; KASSIE, F. Use of a human-derived liver cell line for the detection of cytoprotective, antigenotoxic and cogenotoxic agents. **Toxicology**, v. 198, n. 1, p. 329-340, 2004.

MEHRZADI, S.; BAHRAMI, N.; MEHRABANI, M.; MOTEVALIAN, M.; MANSOURI, E.; GOUDARZI, M. Ellagic acid: A promising protective remedy against testicular toxicity induced by arsenic. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 103, p. 1464-1472, 2018.

MEHRZADI, S.; FATEMI, I.; MALAYERI, A. R.; KHODADADI, A.; MOHAMMADI, F.; MANSOURI, E.; GOUDARZI, M. Ellagic acid mitigates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in male Wistar rats. **Pharmacological Reports**, v. 70, n. 4, p. 712-719, 2018.

MILLER, J. C.; SERRATO, R. M.; CARDENAS, J. M. R.; KUNDAHL, G. A. The Handbook of Nanotechnology. **John Wiley & Sons, Inc**, 2005.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. **Ministério da Saúde**, Brasília, 2º ed., 2009.

MOHANDAS N.; CHASIS J.A.; SHOHET S. B. The influence of membrane skeleton on red cell deformability, membrane material properties, and shape. **Seminars in Hematology**, v. 20, n. 3, p. 225-242, 1983.

MORAES, M. M. Ácido Gálico e Ácido Elágico: taninos com propriedades antileishmania e imunomoduladoras. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Federal do Piauí, 65 p. Teresina 2017.

MONTEIRO NETO, M. A. B.; LIMA, I. M. S.; FURTADO, R. A.; BASTOS, J. K.; SILVA FILHO, A. A.; TAVARES, D. C.; SOUZA LIMA, ILDERCÍLIO MOTA. Antigenotoxicity of artepillin C in vivo evaluated by the micronucleus and comet assays. **JAT. Journal of Applied Toxicology**, v. 31, p. 714-719, 2011.

MORAIS, V.; SIQUEIRA, W.; MARINHO, M.; MELO, A. Análise toxicológica da água do rio capibaribe da cidade de Toritama-PE. **Blucher Biophysics Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 18- 19, 2017.

MOUTINHO, C. G.; MATOS, C. M.; TEIXEIRA, J. A.; BALCÃO, V. M. Nanocarrier possibilities for functional targeting of bioactive peptides and proteins: State-of-the-art. **Journal of Drug Targeting**, v. 20, n. 2, p. 114-141, 2012.

PARRIS, N.; COOKE, P. H.; HICKS, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 12, p. 4788-4792, 2005.

PERCÁRIO, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. **Revista de Nutrição**, v. 23, n. 2, p. 259-267, 2010.

PERRON, N.R.; BRUMAGHIM, J.L. A review of the antioxidant mechanisms of polyphenol compounds related to iron binding. **Cell Biochem. Biophys.** 53:75-100, 2009.

PRIYADARSINI, K.I.; KHOPDE, S.M.; KUMAR, S.S.; MOHAN, H. Free radical studies of ellagic acid, a natural phenolic antioxidant. **J Agric. Food Chem.** 50: 2200-2206, 2002.

PUGAZHENDHI, A.; EDISON, T. N. J. I.; VELMURUGAN, B. K.; JACOB, J. A.; KARUPPUSAMY, I. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems. **Life Sciences**, v. 200, p. 26-30, 2018.

QUEIROZ, T. B. Q. Estudo do potencial citotóxico e genotóxico do geraniol em células mononucleares do sangue periférico e de hepatocarcinoma humano HepG2. **Dissertação (Mestrado)**, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2017.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M.D.A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **Food Science and Technology**, v. 44, p. 1880 – 1887, 2011.

RENU, K.; ABILASH, V. G.; PB, T. P.; ARUNACHALAM, S. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy-An update. **European Journal of Pharmacology**, 818, 241-253, 2018.

REIS, C. P.; NEUFELD, R. J.; RIBEIRO, A.J.; VEIGA, F. Nanoencapsulation I. Methods for preparation of drug-loaded polymeric nanoparticles. **Nanomedicine: Nanotechnology, Biology, and Medicine**, v. 2, n. 1, p. 8-21, 2006.

REIS, C. P.; RIBEIRO, A. J.; HOUNG, S.; VEIGA, F.; NEUFELD, R. J. Nanoparticulate delivery system for insulin: Design, characterization and in vitro/in vivo bioactivity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 30, n. 5, p. 392-397, 2007.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D.M. F.; MARQUES, E. K. Mutagênese ambiental. **Canoas: 1ºed.**
ULBRA, 2003.

ROCHETTE, L.; GUENANCIA, C.; GUDJONCIK, A.; HACHET, O.; ZELLER, M.; COTTIN, Y.; VERGELY, C. Anthracyclines/trastuzumab: new aspects of cardiotoxicity and molecular mechanisms. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 36, n. 6, p. 326-348, 2015.

SHUKLA, R.; CHERIYAN, M. Zein: the industrial protein from corn. **Industrial Crops and Products**, v.13, p. 171-192, 2001.

SMITH W. A.; ARIF J.M.; GUPTA R.C. Effect of cancer chemopreventive agents on microsome-mediated DNA adduction of the breast carcinogen dibenzo[a,l]pyrene. **Mutation Research** 412: 307-314, 1998.

SUDHEER, A. R.; MUTHUKUMARAN, S.; DEVIPRIYA, N.; MENON, V. P. Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. **Toxicology**, v. 230, n. 1, p. 11-21, 2007.

SUWALSKY M.; VARGAS P.; AVELLO M.; VILLENA F.; SOTOMAYOR C.F. Human erythrocytes are affected in vitro by flavonoids of Aristotelia chilensis (Maqui) leaves. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 363, n. 1-2, p. 85-90, 2008.

SZAEFER, H.; JODYNIS-LIEBERT, J.; CICHOCKI, M.; MATUSZEWSKA, A.; BAER-DUBOWSKA, W. Effect of naturally occurring plant phenolics on the induction of drug metabolizing enzymes by o-toluidine. **Toxicology** 186: 67-77, 2003.

TAKAGI, A.; SAI, K.; UMEMURA, T.; HASEGAWA, R.; KUROKAWA, Y. Inhibitory effects of vitamin E and ellagic acid on 8-hydroxy-deoxyguanosine formation in liver nuclear DNA of rats treated with 2-nitropropane. **Cancer Letters** 91: 139-144, 1995.

TAVARES, W. D. S.; MARTIN-PASTOR, M.; TAVARES, A. G.; SOUSA, F. F. Biopharmaceutical Activities Related to Ellagic Acid, Chitosan, and Zein and Their Improvement by Association. **Journal of Food Science**, v. 83, n. 12, p. 2970-2975, 2018.

TEEL, R. W.; CASTONGUAY, A. Antimutagenic Effects of Polyphenolic Compounds. **Cancer Letters**, v. 66, n. 2, p. 107-113, 1992.

TOMASINI, P. P. Análise do óleo essencial de Piper gaudichaudianum na citotoxicidade da doxorrubicina. **(Doctoral dissertation)** 2018.

VALE, E. P. Estudo do Extrato Hidroetanólico de *Punica granatum* Linnaeus e do Ácido Elágico Sobre os Parâmetros Citogenéticos e Toxicológicos em Camundongos Swiss. **Dissertação (Mestrado)**, Fundação Universidade Federal do Amapá, Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Macapá, 2019.

VARSHNEY, M.; VIJAYAN, V.; MESHRAM, G. P. Chemopreventive effects of ellagic acid against genotoxicity induced by benzo (a) pyrene. **Toxicological & Environmental Chemistry**, v. 97, n. 6, p. 786-798, 2015.

VASCONCELOS, M. C.; BEZERRA, D. P.; FONSECA, A. M.; PEREIRA, M. R. P.; LEMOS, T. L. G.; PESSOA, O. D. L.; PESSOA, C.; MORAES, M. O.; ALVES, A. P. N. N.; COSTA-LOTUFO, L. V. Antitumor activity of Biflorin, an o-Naphthoquinone isolated from *Capraria biflora*. **Biological Pharmaceutical Bulletin**, v. 30, p. 1416-1421, 2007.

VATTEM, D. A.; SHETTY, K. Biological functionality of ellagic acid: A review. **Journal of Food Biochemistry**, v. 29, n. 3, p. 234-266, 2005.

VENKATESH, P.; SHANTALA, B.; JAGETIA, G. C.; RAO, K. K.; BALIGA, M. S. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study. **Integrative Cancer Therapies**, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2007.

VIDAL A.; FALLARERO A.; PENA B. R.; MEDINA M. E.; GRA B.; RIVERA F.; VUORELA, P. M. Studies on the toxicity of *Punica granatum* L. (Punicaceae) whole fruit extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 89, n. 2-3, p. 295-300, 2003.

VIRGILI, F.; MARINO, M. Regulation of cellular signals from nutritional molecules: a specific role for phytochemicals, beyond antioxidant activity. **Free Radical Biology & Medicine** 45 1205-1216 (2008).

XU, Y. C.; LIU, X.; LI, M.; LI, Y.; LI, C. Y.; LU, Y.; ZUO, S. B. A Novel mechanism of doxorubicin resistance and tumorigenesis mediated by microRNA-501-5p suppressed BLID. **Molecular Therapy-Nucleic Acids**, v. 12, p. 578-590, 2018.

WANG, H.J. et al. Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility. **Journal Control Release**, v. 105, p. 120-13, 2005.

WANG, K. J.; ZHAO, J. L. Corn silk (*Zea mays* L.), a source of natural antioxidants with α -amylase, α -glucosidase, advanced glycation and diabetic nephropathy inhibitory activities. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 110, p. 510-517, 2019.

WANG, Q.; YIN, L.; PÁDUA, G. W. Effect of hydrophilic and lipophilic compounds on zein microstructures. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 174-181, 2008.

WATERS, M. D.; BRADY, A. L.; STACK, H. F.; BROCKMAN, H. E. Antimutagenicity profiles for some model compounds. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 238, n. 1, p. 57-85, 1990.

YANG F.; TEVES S. S.; KEMP C. J.; HENIKOFF S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, v. 1845, n. 1, p. 84-89, 2014.

YILMAZ, B.; USTA, C. Ellagic acid-induced endothelium-dependent and endothelium-independent vasorelaxation in rat thoracic aorta rings and the underlying mechanism. **Phytotherapy Research**, 27: 285-289, 2013

YUHONG, G.; TINGTING, D.; JINGXIA, Z.; XIAOLONG, X.; PING, L.; LIJUAN, H.; QINGQUAN, L. Fuxin decoction attenuates doxorubicin-induced heart failure in rats via oxidizing suppression and regulating immune responses. **Journal of Traditional Chinese Medicine**, v. 38, n. 4, p. 579-584, 2018.

ZENG, G.; ZHANG, M.; WANG, P.; LI, X.; WU, P.; SUN, D. Genotoxicity effects of Phanerochaete chrysosporium against harmful algal bloom species by micronucleus test and comet assay. **Chemosphere**, v.218, p. 1031-1041, 2019.

Anexo – 1 Parecer do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAPÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS- GRADUAÇÃO
COMITÉ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS – CEUA – UNIFAP

CERTIFICADO

A Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal do Amapá **APROVOU**, na data de 23 de janeiro de 2019, o parecer referente ao protocolo no. **028/2018** e certifica que o Projeto de Pesquisa intitulado "**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E ANTIGENOTOXICIDADE DO ÁCIDO ELÁGICO NANOENCAPSULADO EM ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS DE CAMUNDONGOS SWISS**" coordenado por **DANILO DHEYVISON NASCIMENTO PUREZA**, está de acordo com os princípios de ética e bem estar animal.

CERTIFICATE

The Ethics Committee on Animal Use of the Amapá Federal University **APPROVED** at the meeting of 23 January 2019, the final decision about the Protocol **028/2018** and certify that the research project entitled "**AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE, GENOTOXICIDADE E ANTIGENOTOXICIDADE DO ÁCIDO ELÁGICO NANOENCAPSULADO EM ERITRÓCITOS POLICROMÁTICOS DE CAMUNDONGOS SWISS**" coordinated by **TIAGO GABRIEL CORREIA**, is in accordance with the principles of ethics and animal welfare.

Macapá, 23 de janeiro de 2019

Prof. Tit. José Carlos Tavares Carvalho
Presidente CEUA-UNIFAP
Port. No. 1733/2014

Universidade Federal do Amapá
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós- Graduação
Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA – UNIFAP
Rod. Juscelino Kubitscheck, km 02 – Campus Marco Zero,
Macapá - AP, 68903-419 email: farmacos@unifap.br
Fone (96)4009-2907

Anexo 2 – Comprovante de submissão na *Food and Chemical Toxicology* do Manuscrito: Evaluation of cytotoxicity, genotoxicity and antigenotoxicity of nanoencapsulated ellagic acid .

Food and Chemical Toxicology
Evaluation of Cytotoxicity, Genotoxicity and Antigenotoxicity of Nanoencapsulated ellagic acid.
--Manuscript Draft--

Manuscript Number:	
Article Type:	Full Length Article
Keywords:	Ellagic acid; Nanoencapsulation; Micronucleus; toxicity; Mutagenicity.
Corresponding Author:	Danilo Dheyviston Nascimento Universidade Federal do Amapá BRAZIL
First Author:	Danilo Dheyviston Nascimento
Order of Authors:	Danilo Dheyviston Nascimento Everton Pantoja Vale Lucas Do Rego Paulo Goberlanio Silva Walter Tavares Francisco De Sousa Moacir Neto
Abstract:	<p>Introdução: Ellagic acid is a naturally occurring phenolic phytochemical belonging to the group of ellagitannins, which in turn belong to the group of hydrolyzable tannins of polyphenols. Zein is a natural polymer whose biological potential has also gained attention. Objectives: To evaluate the cytotoxic, genotoxic, antigenotoxic and histopathological potential of nanoencapsulated ellagic acid by the <i>in vivo</i> test system. Methodology: The method used to determine the cytotoxic effect was by calculating the nuclear division index (IDN). To determine genotoxicity and antigenotoxicity, the micronucleus test method was used in peripheral blood cells of male Swiss mice. For genotoxic evaluation, the animals were treated with (ZNP-EA); (EAS) and(BNZp) each solution with a concentration of 5.3 mg / kg b. w., followed by intraperitoneal injection of DXR (15 mg / kg b. w.). Results and discussion: The substances did not show genotoxic activity they showed an antigenotoxic activity with a reduction rate of 92% in 48 hours . There was no cytotoxicity in the tested substances and the Histopathological result revealed that there was no toxicity in relation to the organs. Conclusion: The results reinforce the potential of ellagic acid in combination with zein, providing its great antigenotoxic potential.</p>
Suggested Reviewers:	Andrey D. Durnev addurnev@mail.ru Willian O. Castillo wocastillo@unicauc.edu.co Catarina Satie Takahashi cstakahashi@usp.br Aliy K. Zhanataev azhanataev@yandex.ru Eliana Shimauti eltshimauti@uem.br
Opposed Reviewers:	

Evaluation of Cytotoxicity, Genotoxicity and Antigenotoxicity of Nanoencapsulated ellagic acid.

Danilo Dheyvison Nascimento Pureza^{*a,b}, Everton Pantoja Vale^{*a,b}, Lucas Rodrigues do Rego^{a,c}, Paulo Goberlanio de Barros Silva^e, ^{b,d} Walter de Souza Tavares, Francisco Fábio Oliveira de Sousa^{b,d} and Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto^{a,b,c}.

Affiliation:

^aGenetic and Biomolecular Research Group (GPCBIO), Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, km 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^bPost-graduate Program in Pharmaceutical Sciences, Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^cPost-graduate Program in Health Sciences, Department of Biological Sciences and Health, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá- AP, 68903-419, Brazil.

^dLaboratory of Quality Control, Bromatology and Microbiology, Federal University of Amapá, Rod. Juscelino Kubitscheck, KM 02, S / N, Macapá-AP, 68903-419, Brazil.

^eDivision of Oral Pathology,UNICHRISTUS, Rua João Adolfe Gurgel, 133 - Cocó - Fortaleza, 60190-060, Brazil

E-mail address: danilodv_nascimento@hotmail.com, everton.pantoja.vale@gmail.com, lucasrego.bio@outlook.com, paulo_goberlanio@yahoo.com.br, walter_sou_z@hotmail.com, phabio_oliveira@yahoo.com.br, moacir.monteironeto@yahoo.com.br (Respectively)

*Author corresponding: email: danilodv_nascimento@hotmail.com

Abstract

Introduction: Ellagic acid is a naturally occurring phenolic phytochemical belonging to the group of ellagitannins, which in turn belong to the group of hydrolyzable tannins of polyphenols. The same can be found in plants in their free form, or in the form of ellagitannins, and in the cell membrane. Zeina is a natural polymer whose biological potential has also gained attention.

Objectives: To evaluate the cytotoxic, genotoxic, antigenotoxic and histopathological potential of nanoencapsulated ellagic acid by the in vivo test system. **Methodology:** The method used to determine the cytotoxic effect was determined by calculating the nuclear division index (IDN). To determine genotoxicity and antigenotoxicity, the micronucleus test method was used in peripheral blood cells of male Swiss mice from the Vivarium of the State University of Campinas. For genotoxic evaluation, the animals were treated with nanoencapsulated ellagic acid (ZNP-EA); ellagic acid in free solution (EAS) and blank nanoparticles (BNZp) each solution with a concentration of 5.3 mg / kg b. w .. Peripheral blood samples were collected 24, 48 hours 7, 14 and 21 days for the subchronic treatment. For the antigenotoxic effect, the animals were treated with pre-established concentrations, followed by intraperitoneal injection of doxorubicin - DXR (15 mg / kg b. w.).

Results and discussion: The administered substances did not show genotoxic activity compared to the negative control group. However, when administered with DXR they showed an antigenotoxic activity with a reduction rate of 92.01% in 48 hours compared with the

positive control group showing that it was able to decrease micronuclei in polychromatic erythrocytes. There was no cytotoxicity in the tested substances and the Histopathological result revealed that there was no toxicity in relation to the liver, spleen, heart and kidney organs. **Conclusion:** The results reinforce the potential of ellagic acid in combination with zein, providing its great antioxidant and antigenotoxic potential.

Key words: Ellagic acid; Nanoencapsulation; Micronucleus; toxicity; Mutagenicity.

Abbreviations:

Ellagic acid (EA), body weight (b.w.), doxorubicin (DXR), reactive oxygen species (ROS), Deoxyribonucleic acid (DNA), Multidisciplinary Biotherm Center for Biological Research at Animal Laboratory Science Area (CEMIB), University of Campinas (UNICAMP), National Council of Animal Experimentation of Brazil (CONCEA), Animal Use Ethics Committee (CEUA), intraperitoneal injection (i.p.), Micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMN), Nuclear division index (NDI), Polycyclic erythrocytes (PCE), Normochromatic erythrocytes (NCE), Ellagic acid nanoencapsulated (ZNP-EA), Ellagic acid free solution (EAS), White nanoparticles (BZNp).

Highlights

- Peripheral blood micronucleus test is considered a simple and very informative method, detecting DNA damage *in vivo*.
- Nanoencapsulated Ellagic acid does not cause cytotoxic and genotoxic effects under the conditions evaluated.
- Nanoencapsulated Ellagic acid presented a potent antigenotoxic effect, protecting the DNA against damage induced by doxorubicin.
- Nanoencapsulated Ellagic acid does not alter body mass and hematological parameters under the conditions evaluated.

1 Introduction

The ellagic acid (EA, C₁₄ H₆ O₈), is a natural phenolic compound belonging to the hydrolyzable tannins group, has a flat characteristic containing four hydroxyl groups and two lactone groups present in several plant foods, mainly fruits such as nuts, strawberries, raspberry, grapes and blackberries and on medicinal plants. The same may be present in the part of the membrane structure and plant cell wall in free form or forming large complexes of EA with glucose called elagitannins. (González-Sarriás, et al., 2015, Zhou, et al., 2019).

Its physiological functions go beyond the well-being of the plant itself, allowing several biological effects for the human organism, such as healing effects (Al-obaidi, et al., 2014), anti-hemorrhagic (Gopalakrishnan, et al., 2014), bacteriostatic and bactericidal activity against *S. aureus* and *P. aeruginosa* and a high antioxidant activity (Tavares, et al., 2018).

These effects may be related to the antioxidant capacity that this compound performs, either by the mechanism of free radical sequestration or by the chelation of metallic ions (Larrosa, et al., 2010). In this way, can act against oxidative stress, being one of the main responsible for causing oxidative damages in the organismo, besides acting indirectly in the activation of cell antioxidant enzymatic systems (Mehrzahl et al., 2018).

In this way, oxidative stress arises from the imbalance between the production of reactive oxygen species (ROS), which can cause serious damage to proteins, lipids, genetic material and even result in cell death. Thus, free radicals excess are considered a danger to human health, and can trigger numerous cardiovascular, kidney and cancer diseases (Wang, Zhao, 2019). For this reason, the effects produced by EA in the prevention of oxidation-related diseases have been extensively studied.

Phenolics have a characteristic of binding to the genetic material at the site that normally would occur the reaction between the active metabolites of the carcinogen and the deoxyribonucleic acid (DNA), forming a carcinogen - DNA link, a crucial step for the onset of carcinogenesis (Bhattacharya; Firozi, 1988, Dixit, Gold, 1986, Khanduja, Majid, 1993).

These substances are classified as demutagenic, acting as protection against mutagenic substances before acting on DNA and bio-antimutagenic substances that act on metabolic processes of repair (Rhee, Park, 2001).

Although several studies have focused on different biological activities of EA, little focus has been given to the effects on genetic material. It is known that EA can induce apoptosis and inhibit the proliferation of many types of cancer cells in vitro and in vivo. (Boehning, et al., 2018).

Zein, one of the main corn storage proteins, is an excellent medium for the production of nanoparticles (WANG; YIN; PÁDUA, 2008). Being used in the formation of nanoparticles for the

encapsulation of essential oils (PARRIS; COOKE; HICKS, 2005); vitamins (LUO; TENG; WANG, 2012); chemotherapeutic agent (LAI ,; GUO, 2011) among other compounds. They have a recognized coating capacity for bioactive compounds (LAWTON, 2002; SHUKLA; CHERYAN, 2001; HAMAKAR et al., 1995).

Zein is an important coating material, as it has characteristics such as: natural and renewable source, biodegradability, low cost, bioavailability, long history of use (PATEL; VELIKOV, 2011; LIN et al., 2011; LUO et al. , 2010; SHUKLA; CHERYAN, 2001) hydrophobicity, bioadhesion, high film-forming capacity, good binding capacity with drugs, elasticity and potential for cellular absorption (LUO et al., 2013; PATEL; VELIKOV, 2011; QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011; HAWKINS; SOONSHIONG; DESAI, 2008; WANG et al., 2005; SHUKLA; CHERYAN, 2001).

Accordingly, EA has attracted a significant interest as a potential chemotherapeutic compound, which can provide a better quality of life for human health, also, studies focused on this substance, contributes to increase knowledge about the true effects of EA in the body. In this context, the present study aimed to evaluate the genotoxic, antigenotoxic and toxicological effects of ellagic acid nanoencapsulated in vivo.

2 Material and methods

2.1 Chemicals

Ellagic acid (purity≥95%) was purchased from Sigma-aldrich® (Saint Louis, Missouri, USA). The chemotherapeutic doxorubicin (DXR) (Rubidox® Smartfarma Ltda., São Paulo, SP).

2.2 Preparation and characterization of ellagic acid solution and nanoparticles

The nanoparticles were obtained by nanoprecipitation, according to our previously described method, using zein protein as a carrier and EA at 288 µg/ml. Briefly, zein was dissolved in ethanol, which was thereafter diluted with ultra-pure water. Separately, a methanolic solution of EA was prepared and added dropwise under constant stirring, resulting in the nanoparticles loading and formation (EA_{ZNp}). Blank zein nanoparticles (B_{ZNp}) were prepared in the same manner, except for the absence of drug, and used as control. An EA solution prepared in the same manner, except for the absence of zein was been used to compare the effect of the nanoencapsulation in the biological activities of EA.

Size, polydispersity index (pdl), zeta potential and pH for the nanoparticles were: EA_{ZNp} (568.6 nm, 0.218, +36.1mV and 4.7) and B_{ZNp} (313.9 nm, 0.151, +33.0 mV and 5.7), determined

using a dynamic light scattering (DLS) analyzer (Zetasizer® Nano-ZS90, Malvern Instruments).

Blank, ellagic acid-loaded nanoparticles (EA_{ZNp}) and the corresponding solution (EA_{Sol}) were administered in a volume of ml. To obtain the dose of 5.3 μ g/kg, freshly prepared nanoparticles and solution were diluted in purified water.

2.3 Chemical agent inducing DNA damage

The doxorubicin chemotherapy (DXR) (Rubidox® Smartfarma Ltda., São Paulo, SP) was used to induce DNA damage in peripheral blood cells (positive control). The inducer was dissolved in distilled water and administered intraperitoneally (0.3 mL / animal). The concentration of DXR (15 mg / kg body weight, p.c.) was established according to the literature (FRANKE et al., 2005; VENKATESH et al., 2007).

2.4 Obtaining and maintaining animals

Swiss male mice aged 6 - 7 weeks and approximately 25 + 5 g of body weight (bw), from the Vivarium of the Multidisciplinary Center for Biological Research in the Area of Laboratory Animal Science (CEMIB) of the State University of Campinas, were used. (UNICAMP) The research was conducted according to internationally accepted protocols for the use and care of laboratory animals. They were kept in plastic boxes in an experimental room, under controlled conditions of temperature (23 + 2 °C), humidity (50 + 10%), 12 hours of light-dark cycle, with *ad libitum* access to food and water. The treatment protocols performed in this work were approved by the Ethics Committee on the Use of Animals (CEUA) of the Federal University of Amapá (Protocol 028/2018).

2.5 Experimental design

The animals were randomly divided into eight groups, containing five mice in each treatment group. The concentrations used of nanoencapsulated ellagic acid (5.3 mg / kg / b.w.), ellagic acid in free solution (5.3 mg / kg / b. w.) And white nanoparticles (5.3 mg / kg / b. w.) were determined based on a previous study where we carried out the evaluation of genotoxicity and antigenotoxicity of ellagic acid isolated in the concentration of 5,3mg / kg / b.w. doin which the Guide for Conducting Non-Clinical Studies on Toxicology and Pharmacological Safety Necessary for the Development of Medicines of ANVISA in 2013 and works in the literature, administered by gavage (0.5 mL) for 21 consecutive days, were used at intervals 24 hours, doxorubicin (15 mg / kg b.w.) was administered with an intraperitoneal injection (ip) and samples were subsequently collected.

The animals were weighed daily before gavage, in order to assess possible changes in body mass resulting from the treatment. During the treatment period, collections of the caudal vein (24 hours, 48 hours, 7 days, 14 days and 21 days) were performed for the micronucleus test. Subsequently, the mice were euthanized through a gas camera (CO₂) with continuous flow, to collect the organs of interest (liver, spleen, heart and kidneys), which were weighed on a high-precision scale and evaluated macroscopically. Then, the organs were stored in collecting tubes, duly identified, containing 10% buffered formaldehyde solution, thus maintaining the conservation of the specimens until the histopathological analyzes carried out at the Unichristus University Center.

2.6 Micronucleus test

The micronucleus test was performed according to the method described by MacGregor et al. (1980) with modifications: The animals' tails tip was cut and a blood drop was dripped and dragged over clean blades, whose were left drying at room temperature. Immediately after drying they were fixed in methyl alcohol PA for 5 minutes and again dried at room temperature. After 24 hours, the blades were stained with diluted Giemsa dye (Ministry of Health, 2009) for 20 minutes. The blades were then washed to remove the excess of dye, dried at room temperature and read in an optical microscope (Opton TIM-2008) on the immersion objective (100x).

Micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMN_s) in peripheral blood samples were calculated from 2000 cells and the nuclear division index (NDI) was determined as the ratio of polycyclic erythrocytes (PCE) to normochromatic erythrocytes (NCE) (PCE/NCE) based on 400 erythrocytes per animal (Mersch-Sundermann et al., 2004). The reduction in the frequency of PCEMN_s was calculated according to the following formula, Waters et al. (1990): % Reduction = (A-B) / (A-C) x 100.

At where A was the group treated with DXR (Positive Control), B the group treated with nanoencapsulated ellagic acid + DXR or ellagic acid in free solution + DXR or nanoparticles on white + DXR and C was the group treated with water (Negative Control).

2.7 Subacute toxicity test

2.7.1 Body mass of animals

The animals were checked daily during the experiment to evaluate the resulting body mass (in g) variation and compared between the treatments received.

2.7.2 Histopathology of selected organs

For the histological evaluation, the following organs (liver, spleen, heart and kidneys) obtained after the mice euthanasia were collected and analyzed for lesion signs, size and color changes. The mass of these organs was also measured. After weighed, the organs were fixed in 10% buffered formaldehyde. Afterwards, they were sectioned, placed in cassettes and submitted to automated histotechnical processing. Slices of 4 µm thick were prepared, Hematoxylin-Eosin-stained and assembled in Canada balsam (Junqueira, Junqueira, 1983) for conventional light microscopic analysis.

2.8 Statistical analysis

The results obtained in the various analyzes are expressed as mean ± standard deviation of the mean of each experimental group. The analysis of variance (ANOVA) was used to compare the data of the groups evaluated, followed by the Tukey test, with significance of 5% ($p < 0.05$). The Graphpad Prism® software 7 was used for the statistical analysis.

3 Results

3.1 Micronucleus test

3.1.1 Genotoxicity and antigenotoxicity of ZNP-EA, EAS and BNZp

In the genotoxicity assay, no significant differences ($p > 0.05$) were observed in the frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes between the ZNP-EA, EAS, BNZp groups and the negative control group (Table 1), demonstrating a total absence of genotoxicity. On the other hand, the positive control group treated with DXR significantly increased the frequency of micronuclei compared to the negative control group. In addition, when ZNP-EA, EAS was associated with DXR, it significantly reduced the frequency of micronuclei, demonstrating a potent antigenotoxic effect with reduction rates of 78.3 and 74.5% in 24 hours and 92 and 87.1% within 48 hours for the 5.3 mg / kg dose, respectively (Figure 1). Compared to the positive control (DXR) the group that received ZNP-EA was able to reduce the genotoxic effect of DXR to the same level as the untreated group of DXR after 48h.

3.1.2 Nuclear division index – cytotoxicity

The analysis of the nuclear division index (NDI), there was no significant differences between the treatment groups compared to the control group ($p>0.05$), indicating that ZNP-EA at the tested dose did not present cytotoxic effects during the treatment period (from 24 hours to 21 days) (Table 2)

3.2 Subacute toxicity assay

3.2.1 Body mass of animals

The analysis of body mass in this study was performed daily to verify possible weight changes (gain or loss of body mass) in mice treated with different concentrations of ZNP-EA, EAS and BNZp. According to the variation observed between the groups, no significant changes in the body mass (g) of the animals ($p>0.05$) has been observed (Figure 2).

3.2.2 Histopathologic examination

In view of the parameters of Organs vital organs, color, texture, size and anatomical aspect, no macroscopic changes were observed. Likewise, there were no significant differences ($p> 0.05$) in the organ mass of animals treated with the same concentration as ZNP-EA, EAS and BNZp (Table 3). Some occasional morphological changes have been observed microscopically in animals. Regarding the Spleen, the positive control group showed a notable white pulp hyperplasia, as well as in the group treated with nanoencapsulated ellagic acid. Discrete red pulp congestion could be observed in an animal in the white nanoparticles group (zein) and an animal in the ellagic acid group in free solution.

In the liver samples, the negative control group showed no inflammatory foci or signs of micro / macrovesicular steatosis or necrosis / apoptosis. In the positive control group, slight hepatocyte cell swelling can be observed, as well as considerable portal and centrilobular vein congestion, Kupffer cell hyperplasia and sinusoidal hemorrhage. In the white nanoparticles (zein) group, there was portal and centrilobular vein congestion, hepatocyte cell swelling and Kupffer cell hyperplasia could also be observed, in addition to mild hydropic degeneration. In the group treated with free ellagic acid the results were similar with the samples showing portal and centrilobular vein congestion, hepatocyte cell swelling, Kupffer cell hyperplasia and considerable hydropic degeneration. In the group treated with nanoencapsulated ellagic acid, the findings of portal congestion and centrilobular vein, swelling of hepatocytes and hyperplasia of Kupffer cells were not observed despite slight hydropic degeneration.

Regarding the kidneys (right and left) in the negative control, positive control and blank nanoparticles (zein) groups, there was no cell swelling or vacuolization of the tubular epithelium, however, in the positive control group, cell and interstitial swelling was observed. In the group

treated with ellagic acid, cell and tubular epithelial swelling can be observed, but without vacuolization of the same and notable tubular and interstitial hemorrhage. Occasional outbreaks of colindrohialino could be observed in the group with free ellagic acid, but not in the nanoencapsulated one.

4 Discussion

According to Teel and Castonguay (1992), EA is absorbed rapidly by the gastrointestinal system (15 minutes) after oral administration of the same. In this study, the administration of EA was for 21 consecutive days at 24-hour intervals, thus causing an optimal absorption. In this way, we try to value the way society uses these products, since this substance is present in various foods and different natural products. In this context, we can assume that the use of this substance is considered safe for the use, mainly of some products natural that have in their constitution the EA, thus not changing the body weight.

Studies have already been reported to evaluate the cytogenetic effect of EA. Grossi, et al. (2014), found that EA (50 and 100 mg / kg b.w.) alone had no effect on MNPCEs, PCEs / NCEs and % PCEs, during five days of treatment, compared to control. In this study, the micronucleus test there was no evidence of an increase in the micronucleus frequency in polychromatic erythrocytes, stating that the EA has no genotoxic effect under the conditions employed. In addition, the NDI analysis, no changes in cell proliferation were observed, demonstrating the absence of cytotoxic effect according to the treatment protocols used in the study. The cytotoxicity of a substance is directly proportional to its concentrations and route of administration, besides the time of exposure of the individual (Macgregor, et al., 1987; Kumar et al., 2009). One factor that may have contributed to this fact is the antioxidant effects that EA presents against different substances (Tavares, et al., 2018).

However, treatment with DXR showed a significant increase in the frequency of micronuclei in polychromatic cells in peripheral blood in relation to the negative control group, demonstrating a potential genotoxic effect of this substance. These results corroborate with the study conducted by Carneiro, et al. (2017) which demonstrated DNA damage caused by DXR in polychromatic erythrocytes of Swiss mice using the concentration of 15 mg / kg b.w. In this context, many mechanisms are suggested for DXR, such as inhibition of protein synthesis and DNA replication by the ability to intercalate with DNA, however, oxidative stress is the main mechanism of this substance, thus causing damage to genetic material (Minotti et al., 2004).

Several studies report the protective effects of EA against different substances that cause damage to the body, including DXR. Sudheer, et al. (2007) found an increase in the frequency of micronucleus in lymphocytes treated with nicotine, but the same study demonstrates that the simultaneous treatment with EA significantly reduces the micronucleus frequency, thus playing a

protective effect against nicotine toxicity. In the study by Varshney; Vijayan; Meshram (2015), there was a reduction in the mean number of micronucleated polychromatic erythrocytes in the presence of EA (10 mg / kg b.w.), thus demonstrating the antimutagenic role played by EA against the mutagenic activity of Benzo and Pyrene in systems in vitro and in vivo.

These results corroborate our study, at where we demonstrated the potential antimutagenic effect of the use of ZNP-EA associated with DXR at all doses tested, with a significant (%) reduction in the frequencies of micronuclei in polychromatic erythrocytes of up to 92% in 48 hours, when compared to the positive control.

The possible reason for the antigenotoxic behavior of ZNP-EA can be related to its antioxidant effects (Tavares, et al., 2018), thus reducing damages to the cellular structure and genetic material caused by substances of both origin natural and synthetic. A study by Kilic, Yeşiloğlu and Bayrak (2014), concluded that EA has an antioxyd activity, inhibiting 71.2% of lipid peroxidation. According to Firdaus et al. (2018) demonstrated that pre and co- administration of EA at doses of 20 and 40 mg / kg causes a marked reduction in the total production of reactive oxygen species in a dose dependent manner and is considered a promising therapeutic candidate against neurotoxicity.

The sporadic occurrence of lesions have been observed in the organs, both in the treated and untreated control groups. In this context, the treatment with ZNP-EA did not induce serious lesions in the organs, while the alterations observed are the result of low toxicity related to the continuous use. Thus, lipid peroxidation is the main means of altering the functions and structure of the plasma membrane of a cell, generally resulting in cell death (Percario, 2010). This may explain our findings, as no significant changes in the or histopathological appreciation were noticed, resulting in little or no toxicity in comparasion to the control group.

The antioxidant effects that EA presents may have caused the decrease of these oxidative damages in the cells of the body. This may explain the poor toxicity of ellagic acid in the organs. In summary, our results showed that ZNP-EA is not genotoxic and cytotoxic . Additionally, it presented a substantial antigenotóxico effect and as such, could be considered an important alternative to chemoprevent diseases related to oxidative and DNA damages.

Final considerations

Our findings show that the ZNP-EA did not cause any significant changes in body mass, hematological, genotoxic and cytotoxic aspects in vivo. In the histopathologic appreciation a low toxicity has been noticed in specific organs. Aditinally, in the dose studied presented a substantial antigenotoxic effect reaching up to 92% protective effect. Therefore, these results may optimize the use of ZNP-EA and provide an alternative to prevent the DNA damage and minimize

the side effects caused by various chemotherapeutics, including DXR, genotoxic effect and as such, could be considered an important alterna.

Acknowledgments

This study was funded in part by the Coordination of Improvement of Higher Level Personnel / Amapá Research Support Foundation (CAPES / FAPEAP), by the CAPES / FAPEAP Grant Program. We would like to thank the Federal University of Amapá (UNIFAP) and the University Center Unichristus.

Author Contributions

Danilo Dheyvison Nascimento Pureza designed the study, performed the toxicity, Cytotoxicity, Genotoxicity and Antigenotoxicity assays, and drafted the manuscript. Lucas Rodrigues do Rego assisted in Micronucleus test. Everton Pantoja Vale assisted in Micronucleus test. Paulo Goberlanio de Barros Silva performed the histological study and interpreted the data. Francisco F. O. Sousa designed the study, drafted the manuscript, and interpreted the data. Moacir de Azevedo Bentes Monteiro Neto designed the study, drafted the manuscript, and interpreted the data.

References

Al-Obaidi, M. M. J., Al-Bayaty, F. H., Al Batran, R., Hassandarvish, P., & Rouhollahi, E. (2014). Protective effect of ellagic acid on healing alveolar bone after tooth extraction in rat— a histological and immunohistochemical study. *Archives of oral biology*, 59(9), 987- 999. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2014.06.001>

ANVISA, B. Guia para condução de estudos não clínicos de toxicologia e segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos. Versão 2. Anvisa, Brasília. ALP, H, 970-975, 2013.

Bhattacharya, R. K., & Firozi, P. F. (1988). Effect of plant flavonoids on microsome catalyzed reactions of aflatoxin B1 leading to activation and DNA adduct formation. *Cancer letters*, 39(1), 85-91, [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(88\)90043-2](https://doi.org/10.1016/0304-3835(88)90043-2)

Boehning, A. L., Essien, S. A., Underwood, E. L., Dash, P. K., & Boehning, D. (2018). Cell type-dependent effects of ellagic acid on cellular metabolism. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 106, 411-418, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.06.142>

Carneiro, A. B. A., Pinto, E. J. S., Ribeiro, I. F., Magalhães, M. R. G., & Monteiro, M. D. A. B. (2017). Efeito da *Astrocaryum aculeatum* (Tucumã) na toxicidade da Doxorubicina: modelo experimental in vivo. *Acta Paulista de Enfermagem*, 30(3), 233-239, <http://dx.doi.org/10.1590/1982-0194201700036>.

Dixit, R., & Gold, B. (1986). Inhibition of N-methyl-N-nitrosourea-induced mutagenicity and DNA methylation by ellagic acid. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(21), 8039-8043, <https://doi.org/10.1073/pnas.83.21.8039>

Firdaus, F., Zafeer, M. F., Anis, E., Ahmad, M., & Afzal, M. (2018). Ellagic acid attenuates arsenic induced neuro-inflammation and mitochondrial dysfunction associated apoptosis. *Toxicology reports*, 5, 411-417, <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.02.017>

Franke, S. I. R.; Prá, D.; Da Silva, J.; Erdtmann, B.; Henriques; J. A. P. Possible repair action of Vitamin C on DNA damage induced by methyl methanesulfonate, cyclophosphamide, FeSO₄ and CuSO₄ in mouse blood cells in vivo. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, v. 583, n. 1, p. 75-84, 2005. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2005.03.001

Gopalakrishnan, L., Ramana, L. N., Sethuraman, S., & Krishnan, U. M. (2014). Ellagic acid encapsulated chitosan nanoparticles as anti-hemorrhagic agent. *Carbohydrate polymers*, 111, 215-221, <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2014.03.093>

González-Sarrías, A., García-Villalba, R., Núñez-Sánchez, M. Á., Tomé-Carneiro, J., Zafrilla, P., Mulero, J., & Espín, J. C. (2015). Identifying the limits for ellagic acid bioavailability: A crossover pharmacokinetic study in healthy volunteers after consumption of pomegranate extracts. *Journal of Functional Foods*, 19, 225-235, <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.09.019>

Grossi, M. R., Berni, A., Pepe, G., Filippi, S., Meschini, R., Papeschi, C., & Palitti, F. (2014). Evaluation of the effects of ellagic acid (EA) on 7, 12-dimethylbenz (α) anthracene (DMBA) induced micronuclei in mammalian cells in vitro and in vivo. *Toxicology letters*, 224(2), 240-245, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2013.10.012>

Hamakar, B.R. et al. Efficient procedure for extracting maize and sorghum kernel proteins reveals higher prolamin contents than the conventional method. *Cereal Chemical*, v.72, p. 583-588, 1995.

Hawkins, M.J. et al. Protein nanoparticles as drug carriers in clinical medicine. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 60, p. 876-885, 2008. DOI: 10.1016/j.addr.2007.08.044

Junqueira, L. C. U.; Junqueira L. M. M. S. (1983). Técnicas básicas de citología e histologia. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan.

Khanduja, K. L., & Majid, S. (1993). Ellagic acid inhibits DNA binding of benzo (a) pyrene activated by different modes. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 15(1), 1-9, <https://doi.org/10.3164/jcbn.15.1>

Kilic, I., Yeşiloğlu, Y., & Bayrak, Y. (2014). Spectroscopic studies on the antioxidant activity of ellagic acid. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 130, 447-452, <https://doi.org/10.1016/j.saa.2014.04.052>

Kumar, M. R. S., Aithal, K., Rao, B. N., Udupa, N., & Rao, B. S. S. (2009). Cytotoxic, genotoxic and oxidative stress induced by 1, 4-naphthoquinone in B16F1 melanoma tumor cells. *Toxicology in Vitro*, 23(2), 242-250, <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2008.12.004>

Lai, L. F.; Guo, H. X. Preparation of new 5-fluorouracil-loaded zein nanoparticles for liver targeting. *International Journal of Pharmaceutics*, v. 404, n. 1-2, p. 317-323, 2011. doi: 10.1016/j.ijpharm.2010.11.025

Larrosa, M., García-Conesa, M. T., Espín, J. C., & Tomás-Barberán, F. A. (2010). Ellagitannins, ellagic acid and vascular health. *Molecular aspects of medicine*, 31(6), 513- 539, <https://doi.org/10.1016/j.mam.2010.09.005>

Lin, T. et al. The biodegradation of zein in vitro and in vivo and its application in implants. *Pharma Science Technology*, v.12 , p.172-176, 2011. doi: 10.1208/s12249-010-9565-y.

Luo, Y. et al. Preparation, characterization and evaluation of selenite-loaded chitosan/TPP nanoparticles with or without zein coating. *Carbohydrates and Polymers*, v.82, p.942-951, 2010. doi: 10.1016/j.carbpol.2010.06.029

Luo, Y. et al. Cellular uptake and transport of zein nanoparticles: effects of sodium caseinate. *Journal Agriculture Food Chemical*, v. 61, p. 7621-7629, 2013. DOI: 10.1021/jf402198r

Luo, Y.; Teng, Z.; Wang, Q. Development of zein nanoparticles coated with carboxymethyl chitosan for encapsulation and controlled release of vitamin D3. *Journal Agriculture Food Chemical*, v. 60, p.836-843, 2011. <https://doi.org/10.1021/jf204194z>

MacGregor, J. T., Wehr, C. M., & Gould, D. H. (1980). Clastogen-induced micronuclei in peripheral blood erythrocytes: The basis of an improved micronucleus test. *Environmental Mutagenesis*, 2(4), 509-514, <https://doi.org/10.1002/em.2860020408>

MacGregor, J. T., Heddle, J. A., Hite, M., Margolin, B. H., Ramel, C., Salamone, M. F., & Wild, D. (1987). Guidelines for the conduct of micronucleus assays in mammalian bone marrow erythrocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology*, 189(2), 103-112, [https://doi.org/10.1016/0165-1218 \(87\)90016-4](https://doi.org/10.1016/0165-1218 (87)90016-4)

Mehrjadi, S., Fatemi, I., Malayeri, A. R., Khodadadi, A., Mohammadi, F., Mansouri, E., & Goudarzi, M. (2018). Ellagic acid mitigates sodium arsenite-induced renal and hepatic toxicity in male Wistar rats. *Pharmacological Reports*, 70(4), 712-719, <https://doi.org/10.1016/j.pharep.2018.02.007>

Ministério da Saúde (2009). Manual de diagnóstico laboratorial da malária. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Ministério da Saúde, Brasília, 2º ed.

Minotti, G., Menna, P., Salvatorelli, E., Cairo, G., & Gianni, L. (2004). Anthracyclines: molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. *Pharmacological reviews*, 56(2), 185-229. doi: <https://doi.org/10.1124/pr.56.2.6>

Parris, N.; Cooke, P. H.; Hicks, K. B. Encapsulation of essential oils in zein nanospherical particles. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 12, p. 4788-4792, 2005. doi: 10.1021/jf040492p.

Percário, S. Prevenção do estresse oxidativo na síndrome de isquemia e reperfusão renal em ratos com suplementação nutricional com antioxidantes. *Revista de Nutrição*, v. 23, n. 2, p. 259-267, 2010. <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-52732010000200009>.

Quispe-Condori, S.; Saldaña, M.D.A.; Temelli, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *Food Science and Technology*, v. 44, p. 1880 – 1887, 2011. DOI: 10.1016/j.lwt.2011.01.005

Rhee, C. H., & Park, H. D. (2001). Three glycoproteins with antimutagenic activity identified in *Lactobacillus plantarum* KLAB21. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67(8), 3445-3449. doi: 10.1128 / AEM.67.8.3445-3449.2001

Shukla, R.; Cherian, M. Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, v.13, p. 171-192, 2001. DOI:10.1016/S0926-6690(00)00064-9

Sudheer, A. R., Muthukumaran, S., Devipriya, N., & Menon, V. P. (2007). Ellagic acid, a natural polyphenol protects rat peripheral blood lymphocytes against nicotine-induced cellular and DNA damage in vitro: with the comparison of N-acetylcysteine. *Toxicology*, 230(1), 11-21, <https://doi.org/10.1016/j.tox.2006.10.010>

Tavares, W. D. S., Martin-Pastor, M., Tavares, A. G., & Sousa, F. F. (2018). Biopharmaceutical Activities Related to Ellagic Acid, Chitosan, and Zein and Their Improvement by Association. *Journal of food science*, 83(12), 2970-2975, <https://doi.org/10.1111/1750-3841.14369>

Teel, R. W., & Castonguay, A. (1992). Antimutagenic effects of polyphenolic compounds. *Cancer letters*, 66(2), 107-113, [https://doi.org/10.1016/0304-3835\(92\)90222-H](https://doi.org/10.1016/0304-3835(92)90222-H)

Varshney, M., Vijayan, V., & Meshram, G. P. (2015). Chemopreventive effects of ellagic acid against genotoxicity induced by benzo (a) pyrene. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 97(6), 786-798, <https://doi.org/10.1080/02772248.2015.1063253>

Venkatesh, P.; Shantala, B.; Jagetia, G. C.; Rao, K. K.; Baliga, M. S. Modulation of doxorubicin-induced genotoxicity by *Aegle marmelos* in mouse bone marrow: a micronucleus study. *Integrative Cancer Therapies*, v. 6, n. 1, p. 42-53, 2007. DOI: 10.1177/1534735406298302

Wang, H.J. et al. Heparin-loaded zein microsphere film and hemocompatibility. *Journal Control Release*, v. 105, p. 120-13, 2005. DOI: 10.1016/j.jconrel.2005.03.014

Wang, K. J., & Zhao, J. L. (2019). Corn silk (*Zea mays* L.), a source of natural antioxidants with α -amylase, α -glucosidase, advanced glycation and diabetic nephropathy inhibitory activities. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 110, 510-517, <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2018.11.126>

Wang, Q.; Yin, L.; Pádua, G. W. Effect of hydrophilic and lipophilic compounds on zein microstructures. *Food Biophysics*, v. 3, n. 2, p. 174-181, 2008. <https://doi.org/10.1007/s11483-008-9080-9>

Zhou, B., Li, Q., Wang, J., Chen, P., & Jiang, S. (2019). Ellagic acid attenuates streptozocin induced diabetic nephropathy via the regulation of oxidative stress and inflammatory signaling. *Food and Chemical Toxicology*, 123, 16-27, <https://doi.org/10.1016/j.fct.2018.10.036>

Figura 1: Micronucleated polychromatic erythrocyte (PCEMN) frequency of mice treated with the same concentration of ellagic acid nanoencapsulated + doxurubicin (after 24 and 48 hours), ellagic acid in free solution + doxurubicin (after 24 and 48 hours) and nanoparticles on white + doxurubicin (after 24 and 48 hours) . Values were expressed as mean \pm standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). h: hours; DXR: Doxorubicin; PCE: Polychromatic erythrocyte.

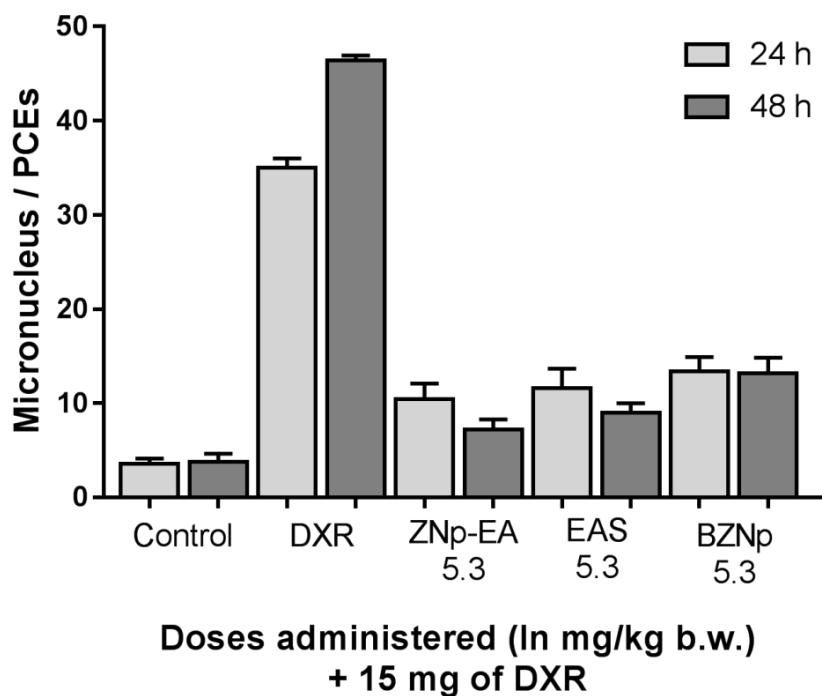


Figura 2: Mean body mass of animals treated with the same concentration of ellagic acid nanoencapsulated, ellagic acid in free solution and nanoparticles on white for 21 days, on the Initial Mass - (A) and Final Mass - (B). Values were expressed as mean \pm standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). DXR: Doxorubicin.

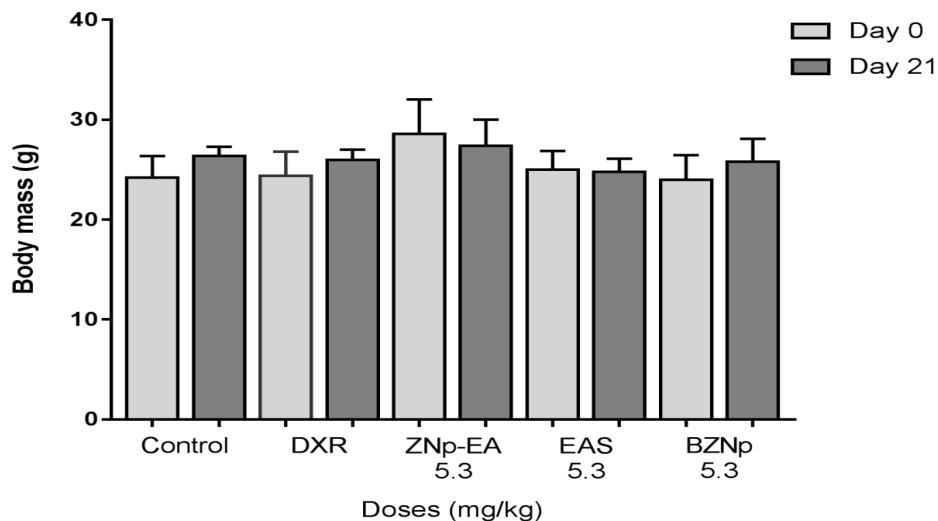


Table 1: Frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes (PCEMN) in peripheral blood of Swiss mice treated with the same concentration of ZNP-EA, EAS and BNZp of and their respective controls.

Treatment (mg/kg b.w.)	PCEMN _s mean ± SD				
	24 Hours	48 Hours	7 Days	14 Days	21 Days
Control	3.6 ± 0.54	3.6 ± 0.54	3.4 ± 1.14	3.6 ± 0.54	3.6 ± 0.89
BZNp	5.4 ± 1.14	5.0 ± 0.70	5.0 ± 0.70	5.2 ± 0.83	4.4 ± 1.34
EAS	3.8 ± 1.09	4.4 ± 0.89	5.2 ± 1.78	5.2 ± 0.44	5.4 ± 1.51
ZNp-EA	5.4 ± 0.89	4.8 ± 0.83	5.2 ± 0.44	3.8 ± 1.30	5.6 ± 1.14
DXR	-	-	-	-	35 ± 1.00

Results are expressed as mean ± standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). ZNP-EA: nanoencapsulated ellagic acid; EAS: ellagic acid in free solution; BNZp: nanoparticles on white. PCEMN_s: Micronucleated polychromatic erythrocyte frequencies.

Table 2:Nuclear division index (NDI) in peripheral blood of mice submitted to the same concentration of nanoencapsulated ellagic acid and / or DXR; ellagic acid in free solution and / or DXR; nanoparticles on white and / or DXR and their respective controls.

Treatment (mg/kg b.w.)	NDI Mean ± S.D.					
	24 Hours	48 Hours	7 Days	14 Days	21 Days	22 Days
Control	0.02 ± 0.44	0.03 ± 0.02	0.03 ± 0.004	0.03 ± 0.007	0.02 ± 0.44	-
BZNp	0.03 ± 4.03	0.02 ± 3.36	0.02 ± 2.23	0.03 ± 4.15	0.03 ± 0.89	-
EAS	0.02 ± 2.95	0.02 ± 1.87	0.03 ± 3.16	0.03 ± 4.63	0.03 ± 3.08	-
ZNp-EA	0.02 ± 2.07	0.04 ± 3.80	0.02 ± 5.76	0.02 ± 1.64	0.03 ± 3.53	-
DXR	-	-	-	-	0.02 ± 0.89	0.02 ± 0.89
BZNp + DXR	-	-	-	-	0.02 ± 2.70	0.04 ± 2.12
EAS + DXR	-	-	-	-	0.03 ± 4.91	0.04 ± 2.38
ZNp-EA + DXR	-	-	-	-	0.03 ± 3.36	0.03 ± 2.82

Values are expressed as mean + standard deviation. (ANOVA and Tukey's test). 400 erythrocytes were analyzed per animal, with a total of 2000 cells per treatment group; NDI: Nuclear division index; DXR: Doxorubicin.

Table 3: Effect of nanoencapsulated ellagic acid, ellagic acid in free solution and nanoparticles on white on the mean organs mass of treated mice and their respective control groups.

Treatment	Dose (mg/kg/day)	Organs (g/100 g of body weight)				
		Liver	Spleen	Heart	Right Kidney	Lefty Kidney
Control	-	1.06 ± 0.05	0.15 ± 0.03	0.14 ± 0.003	0.20 ± 0.02	0.19 ± 0.02
DXR	15	1.11 ± 0.04	0.12 ± 0.02	0.13 ± 0.007	0.17 ± 0.01	0.16 ± 0.01
BZNp	5.3	1.21 ± 0.13	0.09 ± 0.03	0.18 ± 0.01	0.19 ± 0.03	0.18 ± 0.02
EAS	5.3	1.13 ± 0.19	0.07 ± 0.04	0.17 ± 0.03	0.17 ± 0.02	0.17 ± 0.06
ZNp-EA	5.3	1.23 ± 0.23	0.12 ± 0.01	0.18 ± 0.01	0.21 ± 0.03	0.23 ± 0.02

Values were expressed as mean ± standard deviation. Significant differences between the values were expressed as * (p <0.05) and ** (p <0.01) compared to the control group (negative) (ANOVA and Tukey's test). DXR: Doxorubicin.