



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**



**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO FÍTICO
CONTRA O DANO AO DNA INDUZIDO POR ESTRESSE
OXIDATIVO**

MARIA JOSÉ BRYANNE ARAUJO SANTOS

2022



**MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM AGRICULTURA E BIODIVERSIDADE**



MARIA JOSÉ BRYANNE ARAUJO SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO FÍTICO CONTRA O DANO AO
DNA INDUZIDO POR ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

Orientador
Prof. Dr. Ricardo Scher

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL
2022

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237a Santos, Maria José Bryanne Araújo.
Avaliação do efeito protetor do ácido fítico contra o dano ao DNA induzido por estresse oxidativo / Maria José Bryanne Araújo Santos; orientador Ricardo Scher. – São Cristóvão, SE, 2022.
49 f.; il.

Dissertação (mestrado em Agricultura e Biodiversidade) –
Universidade Federal de Sergipe, 2022.

1. Antioxidantes. 2. Solução (Química). 3. Radicais livres (Química). I. Scher, Ricardo, orient. II. Título.

CDU 678.048

MARIA JOSÉ BRYANNE ARAUJO SANTOS

**AVALIAÇÃO DO EFEITO PROTETOR DO ÁCIDO FÍTICO CONTRA O DANO AO
DNA INDUZIDO POR ESTRESSE OXIDATIVO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Sergipe, como parte das exigências do Curso de Mestrado em Agricultura e Biodiversidade, área de concentração em Agricultura e Biodiversidade, para obtenção do título de “Mestre em Ciências”.

APROVADA em 24 de Fevereiro de 2022.

Prof^a. Dr^a. Silmara de Moraes Pantaleão
UFS

Prof. Dr. Edson Luís Maistro
UNESP

Prof. Dr. Ricardo Scher
UFS
(Orientador)

SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL

Com todo meu amor e gratidão, para duas mulheres que sempre serão meu maior exemplo de força e que eu amarei até a eternidade, à minha mainha, Neide, e à minha grande amiga, Clívia Rolemberg. E para minha maior riqueza nesta Terra, ao meu pai Reginaldo. Amo vocês!

Dedico

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a **Deus** por me conceder o dom da vida e por derramar sobre mim suas bênçãos por intercessão do Divino Espírito Santo.

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Ricardo Scher**, agradeço imensamente pela sua orientação, pela confiança depositada, pelo conhecimento compartilhado, pela sua paciência e respeito. Em homenagem ao prof. Scher, dedico os seguintes trechos:

“Ser Orientador é um desafio.

É acreditar na força das pessoas e nas suas capacidades.

É ser amigo que ajuda incondicionalmente, mas que critica construtivamente quando há erro.

É ouvir o silêncio de um olhar, o barulho de uma lágrima.

A alegria de um sorriso ou o calor de um abraço.

É observar, analisar atitudes, ler nas entrelinhas.

Olhar e ver para além do que os olhos alcançam.

Ser Orientador é construir e reconstruir.

Construir alicerces para a vida e reconstruir os caminhos perdidos.”

Aos meus pais, eu agradeço por serem o alicerce da minha vida. Ao meu pai, **Reginaldo**, agradeço por sempre me incentivar na busca dos meus sonhos e pelo seu amor. A minha mãe, **Roseneide** (*in memoriam*), por me amar incondicionalmente e por sempre me preparar para os obstáculos impostos pela vida, porém ela não me ensinou apenas uma coisa: a viver sem ela! Te amo, mãe! Saudades!

Aos meus avós maternos, **Gedário** e **Maria José**, pelo seu amor imensurável e pelas suas orações. Sou grata a vocês dois por tudo que sou! Amo vocês!

Ao meu amado esposo, **Cléber**, por ser meu companheiro de vida, meu melhor amigo e por me escolher todos os dias para compartilhar a vida ao teu lado. Muito obrigada pelas aulas de Excel e Word, por me incentivar a seguir em frente na vida acadêmica e pela sua paciência diária. Te amo, vida!

Ao meu irmão, **Fernando Henrique**, pelo seu amor, companheirismo, pelas caronas da UFS para minha casa e principalmente por ter me presenteado com meus dois sobrinhos. A pureza do amor dos meus sobrinhos, **Pedro** e **Olívia**, tornou a minha caminhada durante o mestrado mais leve e me incentiva todos os dias a ser uma pessoa melhor. Amo vocês!

Agradeço aos meus tios e tias, por acreditarem em meu sonho de ser mestra, em especial a minha madrinha **Leda**, pelo seu amor e por sempre zelar pelo meu bem-estar físico, mental e espiritual.

Aos meus irmãos de coração, **Cauã** e **Malu**, e a minha madrastra, **Norma Lúcia**, pelo carinho e por me apoiarem cotidianamente a alcançar meus objetivos.

Aos meus cunhados (**Cleverton** e **Everton**), as minhas cunhadas (**Ioly**, **Lívia** e **Vanessa**) e a minha querida sogra, **Maria Lúcia**, por estarem sempre na torcida por todas as minhas conquistas.

Agradeço antecipadamente a minha **banca avaliadora**, pelas considerações que serão propostas para o enriquecimento deste trabalho.

À minha chefe do laboratório, **Dra. Silmara Pantaleão**, pela parceria no trabalho, pela confiança e por me incentivar ir sempre além dos meus sonhos. Como sempre digo para ela: “Você sempre será uma das minhas inspirações como cientista”.

Ao meu grupo de pesquisa, GECON/UFS, agradeço a todos os alunos e alunas de Iniciação Científica pelo convívio diário e pelo respeito mútuo.

A todos do grupo de pesquisa do Labicel/UFS, em especial ao meu colega técnico de laboratório, **Jileno Ferreira**, pelo compartilhamento de ensinamentos e por me ajudar com minhas atividades de pesquisa.

À Dra. **Maraisa Feitosa**, por todo conhecimento compartilhado e por estar sempre disponível para elucidar minhas dúvidas.

Aos docentes do Programa de Pós-Graduação em Agricultura e Biodiversidade (PPGAGRI/UFS), pelos ensinamentos, sugestões para meu trabalho e dedicação.

Aos meus melhores amigos e amigas, **Fábio, Suzanne, Marília, Thaís, Isis, Mila, Dani, Clivia** (*in memorian*), **Larissa, Regiane, Érika, Amanda Patrícia e Thaisa** por nunca soltarem minha mão durante esta e outras fases da minha vida. Eu nada seria sem vocês!!!

Agradeço aos meus amigos da pós-graduação **Natielli, Taise, Swamy, Carol, Gilmaro, Lucas Kauan e Tamiris** pela amizade construída e por apoiarem uns aos outros durante essa fase da pandemia.

A todos meus colegas de trabalho, **técnico-administrativos do Departamento de Biologia**, muito obrigada por estarem sempre torcendo por esse diploma de mestra.

Por fim, eu posso dizer com toda certeza de que durante o mestrado, além da "bagagem de conhecimento" adquirida, eu também conquistei uma bagagem de autoconhecimento inexplicável e de inter-relações pessoais positivas.

Encerro esses agradecimentos com lágrimas nos olhos, coração leve e cheio de gratidão! Tenho certeza de que foi um trabalho construído por muitas mãos e eu agradeço a todos que participaram de forma direta ou indiretamente desta construção.

Gratidão Deus!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	i
LISTA DE TABELAS	ii
LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS	iii
RESUMO	v
ABSTRACT	vi
1. INTRODUÇÃO GERAL	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 Estresse Oxidativo	3
2.2 Antioxidantes	5
2.3 Ácido Fítico	6
2.4 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade	10
2.5 Ensaio Cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE).....	12
3. OBJETIVOS.....	16
3.1 Objetivo Geral.....	16
3.2 Objetivos Específicos	16
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	17
4.1 Agentes químicos e soluções	17
4.2 Cultivo celular.....	17
4.3 Avaliação da citotoxicidade em células L929	17
4.3.1 Análise da viabilidade celular em resposta ao tratamento com ácido fólico	17
4.3.2 Análise da viabilidade celular em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	18
4.3.3 Análise da ação do ácido fólico sobre a viabilidade de células L929 expostas ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	18
4.4 Atividade genotóxica e antigenotóxica.....	18
4.4.1 Ensaio Cometa.....	19
4.4.2 Ensaio de Topologia do DNA	20
4.5 Análise estatística	20
5. RESULTADOS	21
5.1 Análise da viabilidade celular em resposta ao tratamento com ácido fólico	21
5.2 Análise da viabilidade celular em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	21
5.3 Avaliação do efeito do ácido fólico sobre a viabilidade de células expostas ao peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂)	22
5.4 Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica do ácido fólico.....	23
5.4.1 Ensaio Cometa.....	23
5.4.2 Ensaio de Topologia do DNA	27

6. DISCUSSÃO.....	30
7. CONCLUSÃO.....	36
8. PERSPECTIVAS	37
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	38

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Espectro de doenças causadas por ação de radicais livres	4
Figura 2: Fontes exógenas e endógenas de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas	4
Figura 3: Estrutura química do ácido fítico	7
Figura 4: Vias de biossíntese do ácido fítico	9
Figura 5: Esquema das etapas do ensaio cometa.....	13
Figura 6: Classificação das classes de danos do DNA pelo ensaio cometa	14
Figura 7: Levantamento dos artigos da base MedLine que utilizaram ensaio cometa nas três últimas décadas.....	15
Figura 8: Porcentagem de fibroblastos murinos (L929) viáveis após 24h de exposição a diferentes concentrações do ácido fítico (mM), avaliado pelo teste do MTT	21
Figura 9: Porcentagem de fibroblastos murinos (L929) viáveis após 40 minutos de exposição a diferentes concentrações do peróxido de hidrogênio, avaliado pelo teste do MTT	22
Figura 10: Porcentagem de fibroblastos murinos (L929) viáveis após o pré-tratamento com AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM) por 24h, seguido da exposição ao H ₂ O ₂ 75 uM por 30 minutos, avaliado pelo teste do MTT	22
Figura 11: Efeito do ácido fítico na redução de dano (%) R ao DNA induzido pelo H ₂ O ₂ 75 uM.....	25
Figura 12: Fotomicrografia do ensaio cometa para detecção de danos no DNA de células L929 pré-tratadas com diferentes concentrações de ácido fítico, seguida da exposição ao H ₂ O ₂ 75 uM.....	26
Figura 13: Conformações estruturais do DNA do plasmídeo.	27
Figura 14: Padrão eletroforético do plasmídeo pET28a no tratamento com ácido fítico	27
Figura 15: Porcentagem de DNA do plasmídeo pET 28a na forma <i>supercoil</i> (superenrolada) após o tratamento com AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM) por 30 minutos	28
Figura 16: Percentual de DNA pET 28a nas formas <i>supercoil</i> após o pré-tratamento com AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM), seguido da exposição ao FeSO ₄ + H ₂ O ₂ por 30 minutos.....	29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Conteúdo de ácido fítico em alguns alimentos	8
Tabela 2. Migração do DNA (média \pm EPM) para avaliação da genotoxicidade do ácido fítico (AF) em células da linhagem L929, com base nas classes de danos observadas	24
Tabela 3. Migração do DNA (média \pm EPM) para avaliação da antigenotoxicidade do ácido fítico (AF) em células da linhagem L929, com base nas classes de danos observadas	25

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

- (%) R - Percentual de redução de dano
 (%) V - Percentual de viabilidade celular
 8-oxoG - 7,8-diidro-8-oxoguanina
 ADP - Adenosina trifosfato
 AF - Ácido fítico
 ANOVA - Análise de variância
 ATP - Adenosina trifosfato
 BER - Reparo por excisão de base
 C - Circular
 Ca - Cálcio
 CAT - Catalase
 CBMN - Ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese
 CDP-DAG - Citidina difosfato diacilglicerol
 CO₂ - Dióxido de carbono
 Cu - Cobre
 DAG - Diaglicerol
 DAPI - 4,6-diamidino-2-fenilindol
 DMEM - Dulbeccos's Modified Eagle Medium
 DMSO - Dimetil sulfóxido
 DNA - Ácido desoxirribonucleico
 EDTA - Ácido etilenodiaminotetracético
 EPM - Erro padrão da média
 ERN - Espécie reativa de nitrogênio
 ERO - Espécie reativa de oxigênio
 ERS - Espécie reativa de enxofre
 EtBr - Brometo de etídio
 Fe - Ferro
 Fe²⁺ - Íon ferroso
 Fe³⁺ - Íon férrico
 FeSO₄ - Sulfato ferroso
 GPx - Glutaciona peroxidase
 H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
 HDL - Lipoproteína de alta densidade
 HOCl - Ácido hipocloroso
 HOO[•] - Radical perhidroxila
 HRR - Reparo direcionado por homologia de quebra de fita dupla, ligações cruzadas e forquilhas de replicação quebradas
 InsP1 - Mio-inositol 3-fosfato
 InsP2 - Mio-inositol 3,5-fosfato
 InsP3 - Mio-inositol 1,2,3,4,5-pentaquisfosfato
 InsP5 - Mio-inositol 1,2,3,4,5-pentaquisfosfato
 InsP6 - Mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato (insP6)
 IP6 - Inositol hexafosfato
 IPK1 - Inositol 1,3,4,5,6 pentaquisfosfato 2-quinase
 IPK2 - Inositol 1,4,5-tris-fosfato quinase
 ITPK - Inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinase
 K - Potássio
 L929 - Linhagem celular de fibroblasto murino
 Lin - Linear

LMP - Agarose de baixo ponto de fusão
mA - Miliampères
Mg - Magnésio
MIK - Mio-inositol quinase
MIK - Enzima mio-inositol quinase
MIPS - Mio-inositol-3 fosfato sintase
mL - Mililitro
mM - Milimolar
MMR - Reparo de incompatibilidade
MPO - Mieloperoxidase
MPP⁺ - 1-metil-4-fenilpiridínio
MTT - Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio))
N27 - Células neuronais dopaminérgicas mesencefálicas
NAC - N-acetil-L-cisteína
NaCl - Cloreto de sódio
NADPH - Adenina dinucleotídeo fosfato oxidase
NaOH - Hidróxido de sódio
NER - Reparo por excisão de nucleotídeos
ng - Nanograma
NHEJ - Reparo por junção de extremidades não homólogas de quebras de fita dupla
NMP - Agarose de ponto de fusão normal
O₂^{•-} - Ânion radical superóxido
OH[•] - Radical hidroxila
PBS - Tampão fosfato salino
PI - Fosfato de inositol
PLC - Fosfolipase C
PtdI4K - Fosfatidilinositol 4-quinase
PtdI5K - Fosfatidilinositol 5-quinase
PtdIns - Fosfatidilinositol monofosfato (PtdInsP1);
PtdInsP - Fosfatidilinositol
PtdInsP2 - Fosfatidilinositol bifosfato
PtdInsP3 - Fosfatidilinositol trifosfato
PtdIS - Fosfatidilinositol fosfato sintase
rpm - rotações por minuto
SBF - Soro fetal bovino
SC - Supercoil
SCGE - *Single Cell Gel Electrophoresis*
SK-Hep-1 - Células de carcinoma hepático humano
SOD - Superóxido dismutase
TAE - Tampão tris/acetato/EDTA
uL - Microlitro
uM - Micromolar
V - Volts
W - Watts
XO - Xantina oxidase
Zn - Zinco

RESUMO

SANTOS, Maria José Bryanne Araujo. **Avaliação do efeito protetor do ácido fítico contra o dano ao DNA induzido por estresse oxidativo.** São Cristóvão: UFS, 2022. 49 p. (Dissertação – Mestrado em Agricultura e Biodiversidade).*

O dano oxidativo ao DNA resulta do processo ocasionado pela superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs). As fontes que geram essas EROs podem ser exógenas ou endógenas. O peróxido de hidrogênio (H_2O_2) é uma ERO que em interação com metais de transição, como Fe^{2+} , produz radicais hidroxila (OH^\bullet), via reação de Fenton. O ácido fítico (AF) ou mio-inositol hexafosfato (IP6), é um composto natural encontrado em cereais, leguminosas e oleaginosas. A sua estrutura química confere a este composto a propriedade quelante de íons metálicos como o Fe^{2+} , o que o torna um agente antioxidante devido a sua capacidade de inibir a formação de radicais ($\bullet OH$) pela reação de Fenton. Considerando a atividade antioxidante do AF, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antígeno-tóxico deste composto contra o dano oxidativo induzido pelo H_2O_2 . Para os ensaios *in vitro* foram utilizados fibroblastos murinos da linhagem L929. Para a determinação da citotoxicidade do AF e do H_2O_2 , foi utilizado o ensaio colorimétrico do MTT. Foi também avaliado o efeito anticitotóxico do AF pelo ensaio do MTT. A avaliação do efeito genotóxico e antigenotóxico do AF foi analisado por duas metodologias distintas, o ensaio cometa alcalino e o ensaio de topologia de DNA plasmidial. De acordo com os resultados obtidos na avaliação da citotoxicidade, foram escolhidas as concentrações do AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM) e do H_2O_2 (75 μM) que apresentaram viabilidade celular superior a 70%. Em relação ao efeito anticitotóxico do AF para as células L929, foi observado um efeito citoprotetor nas concentrações de AF 0,156 mM e 0,0156 mM. Os resultados da avaliação da antigenotoxicidade pelo ensaio cometa mostraram que nas três concentrações testadas do AF houve um percentual de proteção contra o dano oxidativo ao DNA acima de 75%. No ensaio de topologia de DNA foi evidenciado que as concentrações de AF avaliadas não apresentaram genotoxicidade e inibiram parcialmente a clivagem do DNA plasmidial induzida pela via de Fenton. Embora outros estudos sejam necessários, por exemplo, a atividade antimutagênica, estes resultados revelam que, nas concentrações testadas, o ácido fítico protege o DNA contra quebras induzidas pelo estresse oxidativo, demonstrando assim ser um composto antioxidante de ação antigenotóxica que pode ser explorado para a prevenção e/ou diminuição na incidência de patologias.

Palavras-chave: Ensaio Cometa, Antioxidante, Reação de Fenton, Topologia do DNA, Mio-inositol.

* Comitê Orientador: Ricardo Scher – UFS (Orientador)

ABSTRACT

SANTOS, Maria José Bryanne Araujo. **Evaluation of the protective effect of phytic acid against DNA damage induced by oxidative stress.** São Cristóvão: UFS, 2022. 49 p. (Dissertation - Master of Science in Agriculture and Biodiversity).*

Oxidative DNA damage results from overproduction of reactive oxygen species (ROS). Sources of ROS may be exogenous or endogenous. Hydrogen peroxide (H_2O_2) is a ROS that, by interacting with transition metals, such as Fe^{2+} , produces hydroxyl radicals (HO^{\bullet}) via Fenton reaction. Phytic acid (PA), also known as myo-inositol hexaphosphate (IP6), is a natural compound found in cereals, vegetables, and oilseeds. Its chemical structure provides the ability to chelate metal ions such as Fe^{2+} , which characterizes it as an antioxidant agent with the ability to inhibit radical (HO^{\bullet}) formation by Fenton reaction. Considering the antioxidant activity of PA, this study aimed to evaluate the antigenotoxic potential of the compound against H_2O_2 -induced oxidative damage. *In vitro* assays were performed using L929 murine fibroblasts. The cytotoxicity of PA and H_2O_2 was determined by the MTT colorimetric assay. The anticytotoxic effect of PA was also assessed by the MTT assay. Genotoxic and antigenotoxic effects of PA were evaluated by two methods, namely the alkaline comet assay and the plasmid DNA topology assay. On the basis of the results of cytotoxicity assessment, we selected the concentrations of PA (1.56, 0.156, and 0.0156 mM) and H_2O_2 (75 μ M) that afforded cell viabilities greater than 70%. Regarding the anticytotoxic effect of PA on L929 cells, a cytoprotective effect was observed at concentrations of 0.156 and 0.0156 mM PA. The results of the antigenotoxicity test by the comet method showed that, at the three concentrations tested, PA exerted a protective effect (>75%) against oxidative DNA damage. The DNA topology assay showed that PA was not genotoxic at the tested concentrations and partially inhibited the cleavage of plasmid DNA induced by the Fenton reaction. Although further investigations are needed, such as assessment of antimutagenic activity, the current results revealed that, at the tested concentrations, PA protects DNA against cleavage induced by oxidative stress. Thus, PA is an antioxidant compound with antigenotoxic action that may be explored for disease prevention.

Keywords: Comet assay; Antioxidant; Fenton reaction; DNA topology; Myo-inositol.

* Supervisory Committee: Ricardo Scher – UFS (Supervisor).

1. INTRODUÇÃO GERAL

O estresse oxidativo é definido como uma condição de desequilíbrio entre as espécies reativas de oxigênio (EROs) e a defesa antioxidante. O processo de metabolismo celular natural produz as EROs, sendo estas as mais abundantes nos sistemas biológicos e desempenham funções cruciais, como a ativação de vias de sinalização em células eucarióticas que podem alterar o metabolismo intracelular e extracelular (ARULSELVAN *et al.*, 2016). As EROs incluem os radicais livres: ânion superóxido, radical hidroxila, peroxila, alcóxila e óxido nítrico. Além dos radicais livres existem outras EROs não radicais, como o peróxido de hidrogênio, oxigênio singlete e o ácido hipocloroso (GULCIN, 2020; SGHAIER *et al.*, 2016; SINGH *et al.*, 2019).

A superprodução de espécies reativas de oxigênio (EROs) podem causar efeitos deletérios para as biomoléculas, como oxidação do DNA, desnaturação de proteínas e a peroxidação lipídica (KAJARABILLE; LATUNDE-DADA, 2019). As EROs apresentam-se como um constante desafio para a manutenção da integridade do genoma nos organismos aeróbicos (QI; WU; ZHENG, 2019).

Estima-se que ocorre em média cerca de dez mil reações de oxidação que danificam a molécula de DNA por cada célula humana por dia, que constituem desde as oxidações de bases purinas/pirimidinas a quebras de fitas simples/duplas, entre outras lesões (LEE *et al.*, 2012). Estes danos induzidos pelas EROs ao DNA podem ocorrer tanto quimicamente como estruturalmente, resultando em modificações como: sítios abásicos, alterações de todas as bases, quebras de fitas simples e dupla, ligações cruzadas DNA-proteína e arranjos cromossômicos (CAROCHO e FERREIRA, 2013). O radical hidroxila (OH[•]) é uma ERO altamente reativa, sendo considerada a principal ERO que ataca a molécula de DNA (LU *et al.*, 2001; KLAUNIG *et al.*, 2010).

Como consequência do declínio progressivo das funções celulares provocado pelas EROs, o estresse oxidativo está correlacionado à progressão de inúmeras doenças humanas, como Alzheimer, Parkinson, vários tipos de câncer, doenças cardíacas, diabetes e ao envelhecimento (RAJENDRAN *et al.*, 2014).

Considerando os efeitos nocivos da produção excessiva de EROs, os organismos vivos apresentam um complexo sistema de defesas antioxidantes endógenos (enzimático e não-enzimático) e exógenos (fontes alimentares) para neutralizar os processos oxidativos. Um antioxidante é definido como uma molécula capaz de inibir, reduzir, retardar ou eliminar as EROs, protegendo o corpo contra as lesões oxidativas (ALI *et al.*, 2020; LOBO *et al.*, 2010).

Nos últimos anos, a identificação de compostos antioxidantes naturais, principalmente de origem vegetal, tem sido cada vez mais intensificada devido à variedade de compostos bioativos que atuam como potentes agentes antioxidantes, antimutagênicos e antígenotóxicos (SGHAIER *et al.*, 2011).

Numerosos estudos mostraram que na dieta diária, a inclusão de compostos antioxidantes de fontes vegetais naturais pode ser usada para a prevenção de doenças, sendo estabelecida uma relação inversa entre o consumo de alimentos ricos em antioxidantes naturais e a prevalência de doenças humanas (ARULSELVAN *et al.*, 2016).

É nesse contexto que o ácido fítico (AF), também conhecido como hexafosfato de inositol (IP6) ou mio-inositol, constitui um antioxidante natural, sendo extensivamente relatado na literatura como um potente inibidor de radicais hidroxila. Isso se deve a sua propriedade quelante de íons de ferro, que consequentemente inibe a geração de radicais hidroxila durante a reação de Fenton (WEINBERG *et al.*, 2021).

Vale ressaltar que o ferro é considerado um dos elementos essenciais para todas as células, sendo o metal de transição mais difundido (BHOWMIK *et al.*, 2017). Ele participa de algumas funções biológicas como o transporte de oxigênio e é importante para o funcionamento de muitas enzimas envolvidas na transferência de elétrons e reações de oxidação-redução (KEJÍK *et al.*, 2021). Por outro lado, o ferro pode causar danos celulares pelo fato de catalisar

a reação que converte peróxido de hidrogênio em radicais hidroxila (MONTEIRO *et al.*, 2015). De acordo com Meneghini (1997), o ferro está presente no núcleo, sendo responsável pela produção de vários pré-mutagênicos e modificações no DNA, atribuído ao seu papel na produção de radical OH[•].

O ácido fítico é considerado, entre todos os fosfatos de inositol, o mais abundante nas plantas, sendo encontrado em alimentos ricos em fibras, como grãos integrais, cereais, leguminosas, nozes e sementes oleaginosas, e constituindo sua principal fonte de reserva de fósforo (ABDEL-HAMID *et al.*, 2007; PLAAMI, 1997). As atividades biológicas dos inositóis, em especial o mio-inositol e o hexafosfato de inositol (IP6), têm recebido muita atenção devido aos seus múltiplos efeitos benéficos à saúde (CHATREE *et al.*, 2020).

Nas últimas décadas a literatura científica tem enfatizado mais a ação anticancerígena do AF contra vários tipos de câncer, como: próstata, mama, fígado e cólon, porém existem poucos estudos que abordam o espectro genoprotetor deste antioxidante natural e a sua resposta para minimizar a instabilidade genômica (VUCENIK, 2019).

Diante do exposto, pode-se constatar que existem inúmeras pesquisas que visam demonstrar e avaliar o potencial protetor de antioxidantes naturais, principalmente no que diz respeito à sua proteção contra danos ao material genético ocasionado por agentes genotóxicos. É nesse sentido que esse estudo tem como objetivo demonstrar a capacidade antigenotóxica do ácido fítico contra o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio (H₂O₂), por meio do Ensaio do Cometa. Além disso, propõe-se ainda investigar a sua propriedade antioxidante pela sua habilidade quelante de ferro perante a indução da produção de radical hidroxila via reação de Fenton, para comprovar seu potencial protetor ao DNA, através do Ensaio de Topologia do DNA plasmidial.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Estresse Oxidativo

O conceito de “estresse oxidativo” foi proposto pelo pesquisador Helmut Sies (1985), sendo definido como um estado de desequilíbrio entre o balanço de pró-oxidante e antioxidante, a favor do primeiro, resultando no dano oxidativo.

Embora essa definição tenha norteado as pesquisas ao longo de décadas, com a realização de estudos sobre via de sinalização redox, intervenção de antioxidantes e marcadores de estresse oxidativo, tornou-se necessário redefinir o conceito de estresse oxidativo sendo configurado como “uma interrupção da sinalização e controle das reações de oxidação-redução (redox)”, visto que o processo de oxidação de macromoléculas é essencial para a ocorrência da sinalização celular (JONES, 2006).

Halliwell (2007) definiu o estresse oxidativo como sendo um desbalanceamento entre a taxa de produção de espécies reativas (ERs) e as defesas antioxidantes. As ERs são formadas por radicais livres, os quais são definidos como qualquer espécie molecular que contém um ou mais elétrons desemparelhados em um orbital atômico conferindo alta reatividade e instabilidade. Além dos radicais livres, existem as espécies não radicalares (LOBO *et al.*, 2010).

Os radicais podem ser agrupados em três principais classes: as espécies reativas de oxigênio (EROs), as espécies reativas de nitrogênio (ERNs) e as espécies reativas de enxofre (ERSs), estas últimas identificadas recentemente (SHARMA *et al.*, 2012).

Os radicais livres derivados do oxigênio são formados pelo ânion radical superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical perhidroxila (HOO^{\cdot}) e o radical hidroxila (OH^{\cdot}); as espécies não radicalares de oxigênio são o peróxido de hidrogênio (H_2O_2), ácido hipocloroso ($HOCl$) e o oxigênio singlete (1O_2). Os radicais livres derivados de nitrogênio são representados pelo óxido nítrico (NO^{\cdot}) e o dióxido de nitrogênio (NO_2) e as espécies não radicalares representadas pelo peroxinitrito (ONOO) (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). As espécies reativas de enxofre (ERSs) incluem o radical tiil (RS) e a ERS formada pela reação de espécies reativas de oxigênio com tióis (ALI *et al.*, 2020).

Cheeseman e Slater (1993) afirmaram que os radicais livres mais importantes em sistemas biológicos são os derivados de oxigênio. Apesar do oxigênio ser um elemento indispensável para a vida, em altas concentrações este elemento é altamente reativo e provoca a oxidação dos principais constituintes celulares, como lipídios, proteínas, enzimas, aminoácidos e DNA (WOJTCZYK-MIASKOWSKA; SCHLICHTHOLZ, 2018).

Vale ressaltar que, em concentrações baixas e moderadas, as EROs não são necessariamente prejudiciais às células, pois elas atuam como segundos mensageiros e regulam as vias de transdução de sinal intracelular, incluindo a morte de patógenos invasores, cicatrização de feridas e atuam em processo de reparação tecidual (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; HE *et al.*, 2017; LING; KUO, 2018).

O estresse oxidativo é um fator para etiologia de inúmeras doenças como hipertensão, diabetes, obesidade, câncer, aterosclerose, artrite reumatoide, Alzheimer e Parkinson (SABAHI; SOLTANI; MOEIN, 2018; TAFANI *et al.*, 2016). Na Figura 1 são apresentados alguns dos principais efeitos dos radicais livres em alguns órgãos e tecidos humanos.

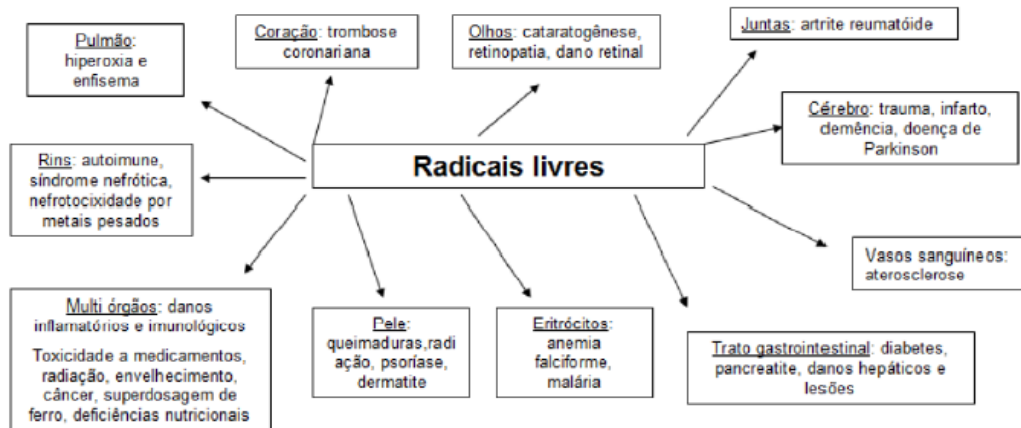


Figura 1. Espectro de doenças causadas por ação de radicais livres (Fonte: Adaptado de BRIEGER *et al.*, 2012).

Ao decorrer da vida as células estão constantemente expostas a espécies reativas de oxigênio geradas de fontes endógenas ou exógenas (Figura 2). As fontes exógenas de EROs incluem tabagismo, exposição aos raios-X, ozônio, poluentes do ar, produtos químicos industriais, quimioterápicos e pesticidas (SOARES, 2002).

Endogenamente as EROs são geradas como produtos de reações bioquímicas na membrana plasmática, no citoplasma, nos peroxissomos, nos lisossomos e nas membranas das mitocôndrias e do retículo endoplasmático (LING; KUO, 2018). Além disso, as EROs podem ser produzidas pela atividade de enzimas celulares, como a nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato (NADPH) oxidase (NOX), xantina oxidase (XO), mieloperoxidase (MPO) e pelo desacoplamento da enzima óxido nítrico sintase endotelial (eNOS) (DI MEO *et al.*, 2016; DROGE, 2002).

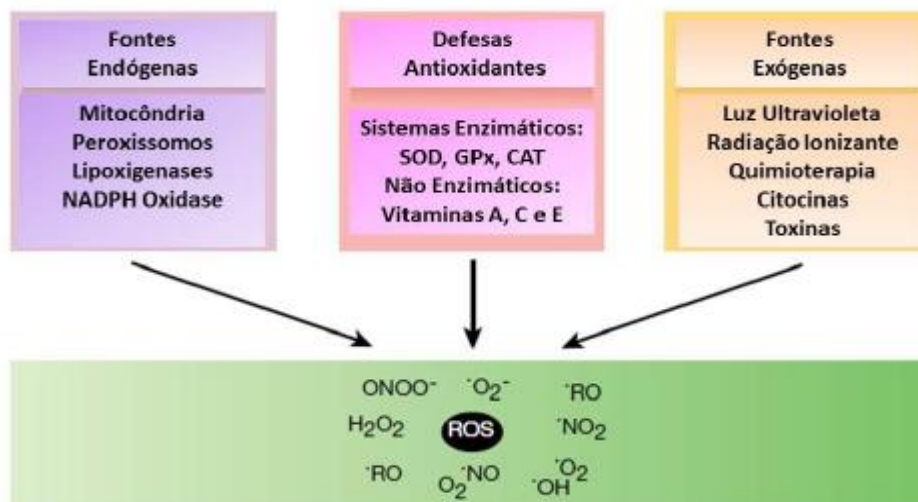
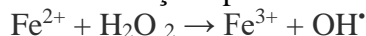


Figura 2. Fontes exógenas e endógenas de espécies reativas de oxigênio e defesas antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas (Fonte: Adaptada de TAN *et al.*, 2015).

Segundo Kucharova *et al.* (2019), a principal fonte de EROs nas células é o metabolismo mitocondrial. As mitocôndrias desempenham funções cruciais, como a respiração e produção de energia na forma de adenosina trifosfato (ATP), o que envolve um sistema complexo de transferência de elétrons. A transferência de elétrons através da membrana interna mitocondrial está associada à geração de EROs, pois ao longo do processo de transporte de elétrons são formados metabólitos altamente reativos de oxigênio, como o radical ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o

qual é convertido em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) pela ação da enzima superóxido dismutase (SOD).

O peróxido de hidrogênio, a depender de sua concentração intracelular, é inofensivo perante as moléculas orgânicas, porém pelo fato dele se difundir facilmente através das membranas celulares, pode interagir com íons de metais de transição que estão disponíveis dentro da célula e, conseqüentemente, resultar na produção de radicais hidroxila (DEMIRCI-ÇEKIÇ *et al.*, 2022). Uma das fontes de produção de OH[•] é a reação de Fenton, que se dá pela combinação entre Fe (II) e H₂O₂, conforme a reação apresentada pela seguinte equação:



De acordo com Chatgialloglu *et al.* (2021), o radical hidroxila é considerado uma das principais fontes de danos ao DNA quando comparado a todas EROs geradas pelo metabolismo celular dos organismos aeróbicos, sendo que este radical reage tanto com a desoxirribose quanto com as bases nitrogenadas.

Estima-se que o dano oxidativo ao DNA resulta em mais de 80 tipos distintos de alterações às bases nitrogenadas, sendo as duas modificações mais comuns a 7,8-diidro-8-oxoguanina, comumente chamada de 8-oxoguanina ou 8-oxoG, e a 2,6-diamino-4-hidroxi-5-formamidopirimidina (FapyG). Ambas são originadas pela adição do radical hidroxila na posição C8 do anel da guanina, resultando em um radical 8-hidroxi-7,8-di-hidroguanil, que pode ser oxidado a 8-oxoG ou reduzido para formar o FapyG. Na interação do radical hidroxila com as bases pirimidinas (timina e citosina), os principais produtos formados são: 5,6-diidroxi-5,6-diidrotimina (timina glicol) e 5,6-diidroxi-5,6-diidroxitosina (citosina glicol) (ALTIERI *et al.*, 2008; SLUPPHAUG; KAVLI; KROKAN, 2003; ZHANG *et al.*, 2019).

Devido à superprodução de EROs durante o metabolismo celular, os organismos desenvolvem diferentes mecanismos de defesas antioxidantes para combater os efeitos deletérios das espécies reativas e, assim, manter a integridade dos componentes celulares (BHATTACHARYYA *et al.*, 2014; ÇERÇI; ERDOST, 2019; WOLPE SIMAS; GRANZOTI; PORSCHE, 2019).

Dessa forma, as EROs produzidas podem ser neutralizadas pela própria célula, através do sistema endógeno antioxidante (enzimático e não-enzimático) ou por antioxidantes exógenos, os quais são obtidos de fontes alimentares (SILVA; JASIULIONIS, 2014), fato esse que tem gerado grande interesse na bioprospecção de compostos bioativos que apresentam atividade antioxidante.

2.2 Antioxidantes

Os antioxidantes são definidos como moléculas orgânicas que apresentam o potencial de inibir, diminuir ou eliminar completamente a ação dos radicais livres, protegendo biomoléculas e estruturas celulares contra os efeitos nocivos dos oxidantes (LOBO *et al.*, 2010; HALLIWELL e GUTTERIDGE, 2007). Pisoschi e Pop (2015) descrevem como as principais funções dos antioxidantes: o controle do estresse oxidativo, a redução na taxa de mutações no DNA, bem como de transformações malignas, dentre outros danos celulares.

Os mecanismos de ação dos antioxidantes são variados e incluem: inibição das reações de oxidação provocadas pelas EROs, interrupção da reação de cadeia de autooxidação, inibição da formação de oxigênio singlete. Além disso, atuam como agentes redutores que convertem hidroperóxidos em compostos estáveis, como quelantes de íons metálicos (como ferro e cobre) e como inibidores de enzimas pró-oxidativas (CAROCHO e FERREIRA, 2013).

O sistema antioxidante é dividido em duas categorias: antioxidantes endógenos e exógenos. As defesas antioxidantes endógenas incluem os mecanismos de remoção ou quebra das espécies reativas por ação enzimática e não enzimática. O mecanismo de defesa antioxidante enzimático envolve a ação das enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CAT) e glutationa peroxidase (GPx) (NIMSE; PAL, 2015).

As enzimas superóxido dismutases são metaloproteínas que constituem a primeira linha de defesa contra a ação dos radicais livres, pois atuam catalisando a dismutação do radical ânion

superóxido ($O_2^{\cdot-}$) em peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e oxigênio (O_2). São identificados três isoformas da enzima SOD nos tecidos de mamíferos: (Cu-Zn-SOD), encontrada no citosol e requer os íons cobre e zinco para sua atividade; a (Mn-SOD), considerado um dos mais importantes componentes antioxidantes da célula, está localizada na matriz mitocondrial e requer manganês para sua atividade; (EC-SOD), secretada para o espaço extracelular como uma glicoproteína tetramérica contendo cobre e zinco em seu sítio ativo (RAHMAN; KODE; BISWAS, 2007).

A catalase é uma enzima ubíqua e considerada a principal enzima antioxidante, sendo encontrada nos peroxissomos das células dos mamíferos (SCHRADER; FAHIMI, 2006). Essa enzima atua catalisando a decomposição do H_2O_2 , resultante da ação da SOD em água (H_2O) e oxigênio (O_2). A CAT está presente em todos os tecidos, porém foi relatada que a maior atividade desta enzima ocorre no fígado e nos eritrócitos (AMIR ASLANI; GHOBADI, 2016; GINTER; SIMKO; PANAKOVA, 2001). Ali *et al.* (2020) afirmam que de acordo com a concentração de H_2O_2 , a CAT pode desempenhar duas atividades enzimáticas. Quando a concentração do H_2O_2 for alta, a CAT atua cataliticamente removendo H_2O_2 e formando o sistema H_2O e O_2 . Quando a concentração de H_2O_2 for mínima e estiver na presença de um doador de hidrogênio, que atua como substrato (por exemplo, metanol, fenol ou etanol), a enzima atua eliminando o H_2O_2 , porém ela oxida o substrato (mecanismo peroxidático).

A glutathiona peroxidase (GPx) é uma enzima que usa como cofator a glutathiona (GSH), um tripeptídeo composto por glutamato, cisteína e glicina, para catalisar a redução de H_2O_2 ou peróxido orgânico (ROOH) em água e álcool (BIRBEN *et al.*, 2012). A GPx pode ser classificada de duas formas: a dependente de selênio e a independente de selênio, sendo essas encontradas no citosol e na mitocôndria, respectivamente (ALI *et al.*, 2020).

Os antioxidantes não enzimáticos são agrupados em duas categorias: os antioxidantes metabólicos e os antioxidantes nutritivos (GINTER; SIMKO; PANAKOVA, 2001). O grupo dos antioxidantes metabólicos é produzido endogenamente pelo metabolismo do corpo, sendo encontrado no plasma, fluidos extracelulares e intracelulares e nas membranas. Temos como exemplo de antioxidantes metabólicos o ácido lipoide, a glutathiona, a L-arginina, a melatonina, o ácido úrico, a bilirrubina, as proteínas quelantes de metais, a transferrina e a coenzima Q10 (RAHMAN, 2007).

Os antioxidantes nutritivos são compostos exógenos, ou seja, são aqueles que não podem ser produzidos pelo corpo, por exemplo, os polifenóis como ácidos fenólicos, flavonoides, antocianinas, lignanas e estilbenos, os carotenoides como xantofilas e carotenos, o resveratrol, a N-acetilcisteína (NAC), o ácido fítico (AF) e as vitaminas C (ácido ascórbico) e E (α -tocoferol). As principais fontes destes compostos antioxidantes são os alimentos naturais, como frutas, vegetais, cereais, cogumelos, ervas medicinais tradicionais, flores, especiarias, podendo também serem obtidos pela ingestão de bebidas ou suplementos dietéticos (POLJSK; ŠUPUT; MILISAV, 2013; SILVA; BRACARENSE, 2016; XU *et al.*, 2017).

Neste contexto dos antioxidantes nutritivos, apresenta-se o ácido fítico por ser considerado um antioxidante natural encontrado em fontes alimentares, como: cereais, nozes, vegetais e grãos. O efeito protetor do AF está relacionado ao seu potencial antioxidante na inibição de EROs (GRAF; EATON, 1985).

De acordo com Andrade *et al.* (2019), os compostos de fontes naturais vem despertando um grande interesse para a comunidade científica, tendo em vista que vários estudos *in vitro* e *in vivo* já comprovaram o potencial terapêutico destes compostos para prevenir e atenuar diversas patologias.

2.3 Ácido Fítico

O ácido fítico (AF), também conhecido como hexafosfato de inositol (IP6) ou mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato (InsP6), é um composto natural que consiste em um carboidrato formado por seis fosfatos ligados ao anel de inositol, com capacidade para ligar-se a um total de 12 prótons (Figura 3). Apresenta como fórmula molecular $C_6H_{18}O_{24}P_6$ e massa

molecular $660,04 \text{ g.mol}^{-1}$ (BOHN; MEYER; RASMUSSEN, 2008; KUMAR *et al.*, 2010; PETROSKI; MINICH, 2020; VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2006).

Quimicamente, é caracterizado como um éster di-hidrogenofosfato de seis vezes de *mio*-inositol ou *cis*-1,2,3,5-*trans*-4,6-ciclohexano-hexol, sendo o mais abundante dos nove isômeros possíveis de inositol (Ins) (MAROLT; KOLAR, 2021). O termo ácido fítico refere-se ao ácido na sua forma livre, porém outras terminologias são usadas, como fitato, quando o IP6 é encontrado na forma de sal livre e fitina para descrever o complexo de IP6 com potássio, magnésio e cálcio (PLAAMI, 1997).

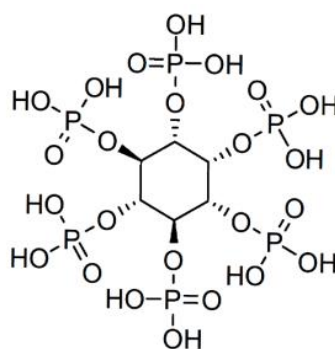


Figura 3. Estrutura química do ácido fítico (Fonte: FEIZOLLAHI *et al.*, 2021).

De ocorrência natural no reino vegetal, o ácido fítico é a principal forma de armazenamento de fósforo em plantas comestíveis, como grãos, nozes, cereais e legumes (COMINELLI *et al.*, 2018; OMORUYI *et al.*, 2013). Entretanto, em quase todas as células de mamíferos pode ser encontrado o IP6, variando em uma concentração de 10 μM a 1 mM (SHAMSUDDIN; BOSE, 2012; VUCENIK; DRUZIJANIC; DRUZIJANIC, 2020).

Nas plantas a quantidade de fósforo armazenado nos tecidos vegetativos é muito inferior quando comparado ao encontrado nas sementes, que corresponde de 60 a 90% do teor de fósforo total (PLAAMI, 1997). Isso se deve ao fato de que o ácido fítico é sintetizado e acumulado na semente durante a fase de desenvolvimento. No entanto, o AF pode ser encontrado em outros órgãos vegetais, como pólen, raízes e tubérculos (RABOY, 2003).

Nas frutas e legumes, a quantidade de ácido fítico apresenta-se de forma variada. Já nos vegetais folhosos este composto é praticamente ausente. Nas raízes e tubérculos os níveis de ácido fítico apresentam-se em quantidades significativas (OMORUYI *et al.*, 2013; PLAAMI, 1997).

A distribuição e a quantidade de ácido fítico pode variar também a depender da espécie vegetal, por exemplo, no caso da cevada, trigo e arroz, nos quais cerca de 80% do ácido fítico são armazenados na aleurona e no farelo (tegumentos maternos) e uma quantidade pequena encontra-se no embrião.

Nas leguminosas encontram-se mais de 95% do ácido fítico armazenados nos cotilédones (ARIZA-NIETO *et al.*, 2007). No milho, 80% deste composto acumulam-se no embrião e escutelo (O'DELL; DE BOLAND; KOIRTYOHANN, 1972).

Os teores de ácido fítico de algumas fontes de alimentos vegetais são mostrados na tabela 1.

Tabela 1. Conteúdo de ácido fítico em alguns alimentos.

Amostra	Ácido Fítico (g/100g)
Milho	0.72-2.22
Trigo	0.39-1.35
Arroz	0.06-1.08
Cevada	0.38-1.16
Sorgo	0.57-3.35
Aveia	0.42-1.16
Feijão vermelho	0.61-2.38
Ervilhas	0.22-1.22
Lentilhas	0.27-1.51
Grão de bico	0.28-1.60
Soja	1.0-2.22
Linhaça	2.15-3.69
Amendoim	0.17-4.47
Amêndoas	0.35-9.42
Nozes	0.20-6.69
Castanha de caju	0.19-4.98

Alguns fatores podem afetar a disponibilidade do ácido fítico nas plantas, como: genética, aplicações de fertilizantes, técnicas de colheita, condições de cultivo, métodos de processamento, métodos de teste e idade do alimento avaliado (COULIBALY ABDOULAYE, 2011; QUIRRENBACH *et al.*, 2009).

A biossíntese do AF ocorre no citosol por duas rotas distintas: a via dependente de lipídios e a independente de lipídios (Figura 4). A via independente de lipídios é predominante nas sementes e tem como precursores da síntese de AF: o mio-inositol e os fosfatos de inositol solúveis. No citosol ocorre uma reação inversa, sendo o mio-inositol livre fosforilado com auxílio da enzima mio-inositol quinase (MIK) e convertido em mio-inositol 3-fosfato (InsP1). Em contrapartida, para a síntese do InsP1 é necessário ter como substrato a glicose 6-fosfato (Glicose 6-P), sendo essa reação catalisada pela enzima mio-inositol-3 fosfato sintase (MIPS). A formação do InsP6 ocorre por meio de uma cascata de fosforilações do anel de inositol, pela ação de várias enzimas (IMP, ITPK e IPK). A partir da molécula do mio-inositol 1,2,3,4,5-pentaquisfosfato (InsP5) é formado o InsP6, sendo esta reação catalisada pela enzima IPK1, na qual sua atuação é comum nas duas vias de biossíntese (dependente e independente) (SPARVOLI; COMINELLI, 2014).

A via dependente de lipídios atua em todos os tipos de tecidos vegetais, exceto nas sementes, tendo como precursores para a síntese de AF: o fosfatidilinositol (PtdInsp ou PI) e fosfatos de inositol. Inicialmente, ocorre a interação entre o mio-inositol com fosfatil lipídios (Citidina difosfato diacilglicerol (CDP-DAG)). O fosfatidilinositol (PtdIns) é formado através da conversão do mio-inositol livre pela ação da enzima PtdIS (fosfatidilinositol fosfato sintase). Posteriormente, o PtdIns é convertido em fosfatidilinositol monofosfato (PtdInsP1) e fosfatidilinositol bifosfato (PtdInsP2), sendo catalisado pelas enzimas fosfatidilinositol 4-quinase (PtdI4K) e fosfatidilinositol 5-quinase (PtdI5K), respectivamente. O PtdInsP2 é convertido em fosfatidilinositol trifosfato (PtdInsP3), por meio da reação catalisada pela fosfolipase C (PLC). A formação do mio-inositol 1,2,3,4,5-pentaquisfosfato (InsP5) ocorre pela reação catalisada pela enzima inositol 1,4,5-tris-fosfato quinase (IPK2), sendo que ao final dessa etapa ocorre a junção das duas vias de síntese da molécula de InsP6 (OMORUYI *et al.*, 2020).

Após a síntese no citosol, o ácido fítico é transportado até o vacúolo através de proteínas transportadoras associadas à multirresistência (MRPs). Ao chegar no vacúolo, o AF é armazenado em estruturas de corpos proteicos denominados de globoides (KUMAR *et al.*, 2021; SPARVOLI; COMINELLI, 2015). No período da germinação o ácido fítico sofre o processo de degradação por ação das enzimas fitases, responsáveis por hidrolisar o fitato para liberar fósforo e outros micronutrientes essenciais e, conseqüentemente, contribuir para o crescimento de mudas (KUMAR *et al.*, 2021; RABOY, 2003).

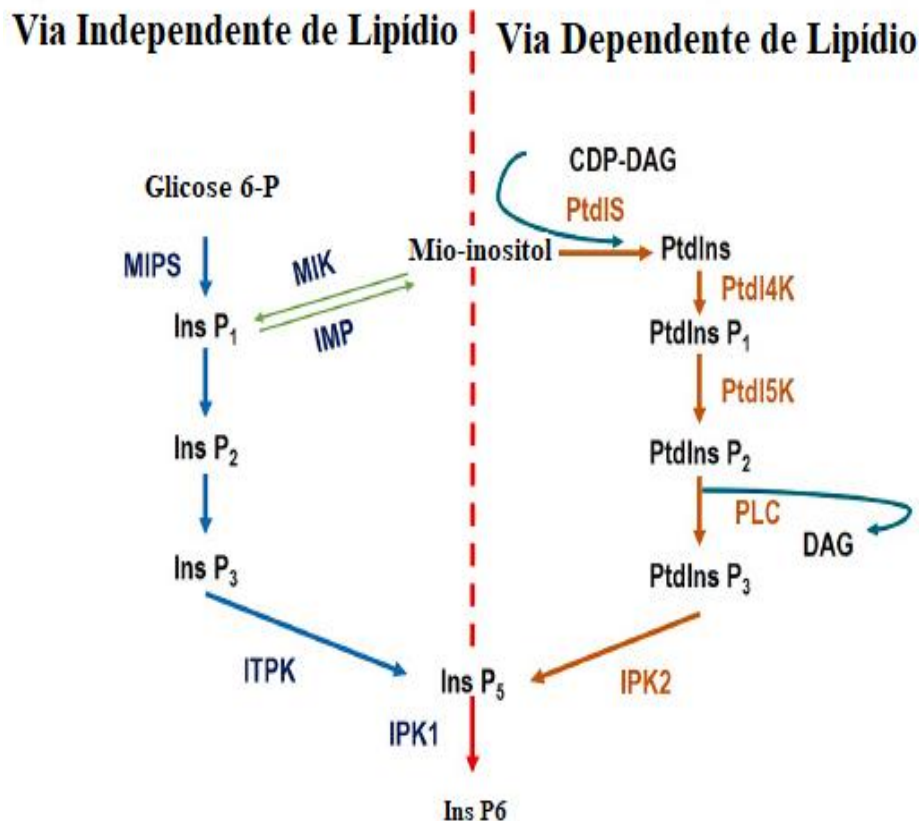


Figura 4. Vias de biossíntese do ácido fítico (independente e dependente de lipídios). Mio-inositol-3 fosfato sintase (MIPS); Mio-inositol 3-fosfato (InsP₁); Mio-inositol 3,5-fosfato (InsP₂); Mio-inositol 1,4,5-fosfato (InsP₃); Mio-inositol 1,2,3,4,5-pentaquisfosfato (InsP₅); Mio-inositol 1,2,3,4,5,6-hexaquisfosfato (insP₆); Mio-inositol-fosfato monofosfatase e galactose-1-fosfato fosfatase (IMP); Mio-inositol quinase (MIK); Inositol 1,3,4-trifosfato 5/6-quinase (ITPK); Inositol 1,3,4,5,6 pentaquisfosfato 2-quinase (IPK1); Citidina difosfato diacilglicerol (CDP-DAG); Fosfatidilinositol fosfato sintase (PtdIS); Fosfatidilinositol (PtdIns); Fosfatidilinositol monofosfato (PtdInsP₁); Fosfatidilinositol bifosfato (PtdInsP₂); Fosfatidilinositol trifosfato (PtdInsP₃); Inositol 1,4,5-tris-fosfato quinase (IPK2); Fosfatidilinositol 4-quinase (PtdI4K); Fosfatidilinositol 5-quinase (PtdI5K); Fosfolipase C (PLC); Diacilglicerol (DAG). (Fonte: Adaptado de KUMAR *et al.* (2021)).

Estudos identificaram que o AF desempenha um papel fundamental nos mais variados processos das células, como a regulação na atividade hormonal (LAHA *et al.*, 2015), resposta ao estresse biótico e abiótico (MUNNIK; VERMEER, 2010), sinalização de cálcio e açúcar (ANANIEVA; GILLASPY, 2009), homeostase do fósforo (KUO *et al.*, 2014), fotomorfogênese, modificação e remodelação da cromatina (LATRASSE *et al.*, 2013) e exportação nuclear de RNAm (LEE *et al.*, 2015).

Além disso, o AF atua como uma molécula sinalizadora envolvida em importantes vias metabólicas celulares e na transdução de sinal como na proliferação celular, diferenciação, exportação de RNA, reparo de DNA, transdução de energia, regeneração de ATP, endocitose e apoptose (BOHN; MEYER; RASMUSSEN, 2008; SHEARS, 2001; WEINBERG *et al.*, 2021).

A estrutura química do ácido fítico, altamente carregado negativamente em pH fisiológico, confere a este composto a capacidade de quelar fortemente importantes cátions minerais, como: ferro (Fe), cobre (Cu), zinco (Zn), potássio (K), cálcio (Ca) e magnésio (Mg), ocorrendo facilmente a precipitação dos mesmos na forma de sais insolúveis (COMINELLI *et al.*, 2018).

A desfosforilação do fitato constitui um pré-requisito imprescindível para promover a melhoria do valor nutricional, pois ocorre a remoção dos grupos fosfatos do anel inositol e, conseqüentemente, diminui a força de ligação entre o mineral e o fitato (KUMAR *et al.*, 2010). Vale ressaltar que o trato digestivo de humanos e animais monogástricos não possui a enzima fitase. Em virtude disso, não é possível metabolizar o ácido fítico devido à ausência das fitases para promover a degradação do fitato (SPARVOLI; COMINELLI, 2014; KUMAR *et al.*, 2010).

Assim, devido à propriedade quelante da molécula do ácido fítico, seu consumo por animais e humanos pode afetar diretamente a biodisponibilidade de cátions minerais, de modo que o AF é considerado por muitos como um antinutriente (KUMAR *et al.*, 2010; FREDLUND *et al.*, 2006). Por esse motivo, os alimentos que contêm ácido fítico não são consumidos na sua forma bruta, com a aplicação de técnicas simples e de baixo custo, que visam reduzir a concentração desse composto nos alimentos, é possível torná-lo viável para o consumo e para melhorar a biodisponibilidade e evitar deficiências de nutrientes (KARKLE; BELEIA, 2010).

De acordo com Gupta *et al.* (2015), existem vários métodos desenvolvidos para reduzir o teor de ácido fítico nos alimentos, bem como para melhorar seu valor antinutricional, tais como: melhoramento genético, fermentação, imersão, germinação e tratamento enzimático com adição de enzimas exógenas.

Muitas pesquisas têm focado nos aspectos antinutricionais do ácido fítico, porém estudos realizados nos últimos anos revelaram que, se consumido em baixas concentrações, o AF apresenta propriedades benéficas (WINDHORST *et al.*, 2013; EAGLE *et al.*, 1956), devido principalmente à sua potente atividade antioxidante via quelação de ferro. Desse modo, o AF desempenha uma função protetora contra o estresse oxidativo e conseqüentemente tem um importante papel na prevenção de várias doenças, como diabetes, câncer, doenças inflamatórias, entre outras (ABDULWALIYU *et al.*, 2019; KUMAR *et al.*, 2021).

Como um antioxidante natural, o ácido fítico inibe a formação do radical hidroxila (OH[•]), catalisado por ferro através da reação de Fenton, ou seja, a habilidade do AF formar um quelato com ferro faz com que ele suprima a catálise desse íon nas reações oxidativas, inibindo assim a formação de radicais hidroxila (BHOWMIK *et al.*, 2017; GRAF; EATON, 1990). Além disso, existem relatos na literatura de que a propriedade antioxidante do AF faz com que este composto seja empregado com outras finalidades, como aditivo de alimentos, sendo utilizado em vários países para prevenir a descoloração dos produtos, melhorar a qualidade nutricional e aumentar a validade dos produtos (GRAF; EATON, 1985).

Como quelante de ferro, o AF pode ser empregado como um suplemento dietético no tratamento de doenças com sobrecarga de ferro. Bhowmik e colaboradores (2017) avaliaram o efeito do AF *in vitro* contra o estresse oxidativo induzido por sobrecarga de ferro em células do fígado. Neste estudo, foi observada a capacidade hepatoprotetora do AF, sendo comprovada por sua ação quelante de ferro, devido sua atividade antioxidante, apresentando conseqüentemente melhora na resposta inflamatória e na imunidade.

Além disso, já foi relatado que alimentos ricos em fitato podem elevar os níveis da lipoproteína de alta densidade (HDL) e promover a diminuição dos índices de colesterol total e da lipoproteína de baixa densidade (LDL) e, conseqüentemente, prevenir contra as doenças cardíacas coronárias (FEIZOLLAHI *et al.*, 2021).

2.4 Genotoxicidade e Antigenotoxicidade

Constantemente, o genoma de todos os organismos vivos sofrem milhares de lesões ao DNA, seja por exposição a agentes tóxicos de fontes exógenas, ou processos endógenos, ou

por erros naturais durante a replicação (SŁOCZYŃSKA *et al.*, 2014). Estima-se que a célula sofre cerca de 10^5 tipos de lesões espontâneas ao DNA por dia (HOEIJMAKERS, 2009).

Tais lesões implicam no bloqueio do processo de replicação e/ou transcrição e, conseqüentemente, podem ocasionar mutações ou aberrações genômicas em larga escala que afetam a função e a viabilidade celular (SOULIOTIS *et al.*, 2020). As lesões de DNA mais comuns podem ser quebras de fitas simples e dupla, ligações cruzadas entre as fitas de DNA, ou entre DNA e proteínas, ou entre DNA e xenobióticos, formação de dímeros, alquilações, oxidações de base purinas e pirimidinas, pontes intercadeias, distorções na hélice, entre outras (HOEIJMAKERS, 2001).

Essa vulnerabilidade do DNA às agressões impostas pelas fontes exógenas e endógenas levou a criação de uma nova área de pesquisa, a Genética Toxicológica, a qual estuda os agentes capazes de danificar o material genético e os cromossomos das células (PHILLIPS, ARLT, 2009). Os agentes que são capazes de causar toxicidade genética, ou seja, produzir danos ao material genético, são descritos como genotóxicos (GONÇALVES; GAIVÃO, 2021; LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2018).

Esses agentes genotóxicos são classificados de acordo com sua origem em três categorias: **física**, que consiste em radiação ionizante, eletromagnética, temperatura e luz ultravioleta; **química**, com destaque para os metais pesados, pesticidas, hidrocarbonetos aromáticos, alquilantes, acridina, acrilamida, epóxidos alifáticos, solventes orgânicos, partículas de amianto, aditivos alimentares e xenobióticos resultantes de certos "estilos de vida", por exemplo, alcoolismo e tabagismo; e **biológica**, que incluem alguns parasitas, bactérias, plantas, vírus e fungos (aqueles que sintetizam metabólitos secundários, como micotoxinas).

Os compostos genotóxicos também podem ser classificados de acordo com seus efeitos ou pelo seu modo de ação em mutagênicos, carcinogênicos ou teratogênicos, tendo como resultado três tipos de processos: mutagênese, carcinogênese e teratogênese (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2018). A mutagênese compreende a ciência que estuda o processo de indução de danos ao material genético pela ação de diferentes agentes, resultando em alterações genéticas (mutações), que podem ocorrer em um único gene, vários genes ou cromossomos inteiros.

As mutações podem ocorrer tanto em células somáticas e/ou células germinativas (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2018; SŁOCZYŃSKA *et al.*, 2014). As mutações somáticas estão associadas em um número crescente de patologias e podem levar à malignidade. As mutações que ocorrem nas células germinativas podem resultar em distúrbios reprodutivos, como a infertilidade, ou induzir mutações hereditárias (DOU *et al.*, 2018; LI *et al.*, 2020).

As mutações pontuais (genes) são aquelas mais comuns e consistem nas alterações que afetam apenas um nucleotídeo ou alguns nucleotídeos dentro de um gene. Os principais tipos de mutações pontuais são: a substituição de um par de bases por outro (substituição), a perda de um ou mais pares de bases (deleção) e a adição de pares de bases extras na sequência de DNA (inserção) (SŁOCZYŃSKA *et al.*, 2014). As mutações que ocorrem a nível organizacional mais superior, como em cromossomos inteiros, são provocadas por agentes clastogênicos ou aneugênicos. Os clastogênicos são aqueles capazes de induzir quebras cromossômicas, e os aneugênicos são aqueles que produzem a perda de cromossomos inteiros ou conjuntos de cromossomos (LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2018).

Embora os termos "genotoxicidade" e "mutagenicidade" sejam frequentemente confundidos, é importante levar em consideração que todos os compostos mutagênicos são genotóxicos, porém nem toda substância genotóxica tem ação mutagênica (NAGARATHNA *et al.*, 2013). Portanto, o termo "genotoxicidade" é considerado um termo mais amplo e diz respeito ao potencial de certos compostos induzir danos à molécula de DNA, porém os efeitos genotóxicos não estão necessariamente relacionados ao processo de mutagenicidade (MAURICI *et al.*, 2016).

Considerando a ocorrência de diferentes tipos de danos ao DNA, as células desenvolveram mecanismos de reparo ao DNA altamente sofisticado e específico para corrigir as lesões que ocorrem ao DNA. As principais vias de reparo são: reparo por excisão de nucleotídeos (NER), reparo por excisão de base (BER), reparo de incompatibilidade (MMR), reparo por junção de extremidades não homólogas de quebras de fita dupla (NHEJ) e reparo direcionado por homologia de quebra de fita dupla, ligações cruzadas e forquilhas de replicação quebradas (HRR). Quando não ocorre o reparo das lesões ao DNA e a depender do grau e do tipo de dano, a célula transmite o genoma mutado para seus descendentes ou pode ser neutralizado por apoptose ou senescência (CICCIA; ELLEDGE, 2010; PATERAS *et al.*, 2015).

Numerosas pesquisas têm sido desenvolvidas com a finalidade de identificar compostos que possam proteger os seres vivos contra os danos ao DNA causados pelos agentes genotóxicos. Tais agentes que exibem esse papel protetor ao material genético são chamados de antígenotóxicos (IZQUIERDO-VEGA *et al.*, 2017).

Vale salientar que inúmeras pesquisas visam à identificação de fitocompostos bioativos com ação antígenotóxica para neutralizar a ação dos agentes genotóxicos, pois estes estão correlacionados ao desenvolvimento de várias doenças humanas. Há um interesse contínuo de explorar a gama de compostos naturais que apresentam ação protetora ao DNA, visto que muitos desses compostos, além da sua ação genoprotetora, também apresentam efeitos benéficos à saúde, como ações imunomoduladoras, hepatoprotetoras, anti-hiperglicêmicas, anti-hiperlipidêmicas, cardioprotetoras, anti-inflamatórias e antirreumáticas, cujo mecanismo de ação está associado às suas propriedades antioxidantes e desintoxicantes (GONÇALVES; GAIVÃO, 2021; LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2018; MITSCHER *et al.*, 1996).

Atualmente, existem diversos ensaios *in vitro* e *in vivo* para avaliar a genotoxicidade e antigenotoxicidade dos compostos, com destaque para o ensaio de mutação bacteriana (teste de Ames), troca de cromátides irmãs (SCE), avaliação de aberrações cromossômicas (ChAb), ensaio de micronúcleo (MN) e, mais recentemente, ensaio cometa.

2.5 Ensaio Cometa ou Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)

A fragmentação do DNA tem sido amplamente utilizada como um marcador de dano oxidativo ao DNA. Neste sentido, o ensaio cometa tem se apresentado como uma ferramenta valiosa para a detecção de danos ao material genético, bem como para avaliar o efeito protetor e/ou reparador ao DNA de diferentes compostos (SABAHI *et al.*, 2018).

O Ensaio Cometa, também conhecido como Eletroforese de Célula Única (em inglês *Single Cell Gel Electrophoresis* - SCGE), é um método simples que tem por finalidade detectar quebras de fita do ácido desoxirribonucléico (DNA) em qualquer tipo de célula eucariótica nucleada (BOLOGNESI; CIRILLO; CHIPMAN, 2019).

Este ensaio pode ser amplamente utilizado em testes de genotoxicidade *in vitro* e *in vivo* (GRAUPNER *et al.*, 2017), de biomonitoramento humano (AZQUETA *et al.*, 2020), ecogenotoxicologia (JHA, 2008), radiação biológica (KUMAR *et al.*, 2014), epidemiologia molecular (ŠRÁM; BINKOVÁ, 2000), nutrigenômica (MACHADO *et al.*, 2019) e em pesquisas básicas sobre o mecanismo de dano e reparo da molécula de DNA (DUAN *et al.*, 2005).

O princípio do ensaio cometa consiste na análise eletroforética de células isoladas embebidas em gel de agarose dispostas sobre lâminas de microscópio. Antes da corrida, as células imobilizadas no gel são lisadas por detergentes e alto teor de sal para a remoção das membranas nucleares, liberando todos os componentes celulares solúveis, como também removendo as histonas do DNA. Mesmo após a lise, o DNA de cada célula permanece intacto ao seu superenrolamento negativo. Assim, o DNA livre das histonas, que recebe o nome de nucleóide, será submetido à eletroforese, ocorrendo assim a migração dos fragmentos de DNA de baixo peso molecular em direção ao ânodo a corrida de curto tempo (Figura 5). Após a coloração, a imagem obtida dos nucleóides assemelha-se a um rastro de uma cauda de “cometa”, justificando o nome do ensaio, sendo que a cabeça compreende o DNA intacto e a

cauda consiste em fragmentos danificados ou quebrados de DNA (AZQUETA; COLLINS, 2013; OSTLING; JOHANSON, 1984).

Inicialmente, a técnica do ensaio cometa foi proposta por Östling e Johanson (1984), que desenvolveram a metodologia de eletroforese do DNA em microgel em condições neutras. Eles utilizaram radiação gama para induzir danos ao DNA de células de mamíferos e detectaram que a extensão da cauda de DNA liberada era diretamente proporcional à dose de radiação, sendo observado que células com uma maior frequência de quebras de fita dupla de DNA (DSBs) apresentaram maior migração em direção ao ânodo (FAIRBAIRN; OLIVE; O'NEILL, 1995; TICE *et al.*, 2000).

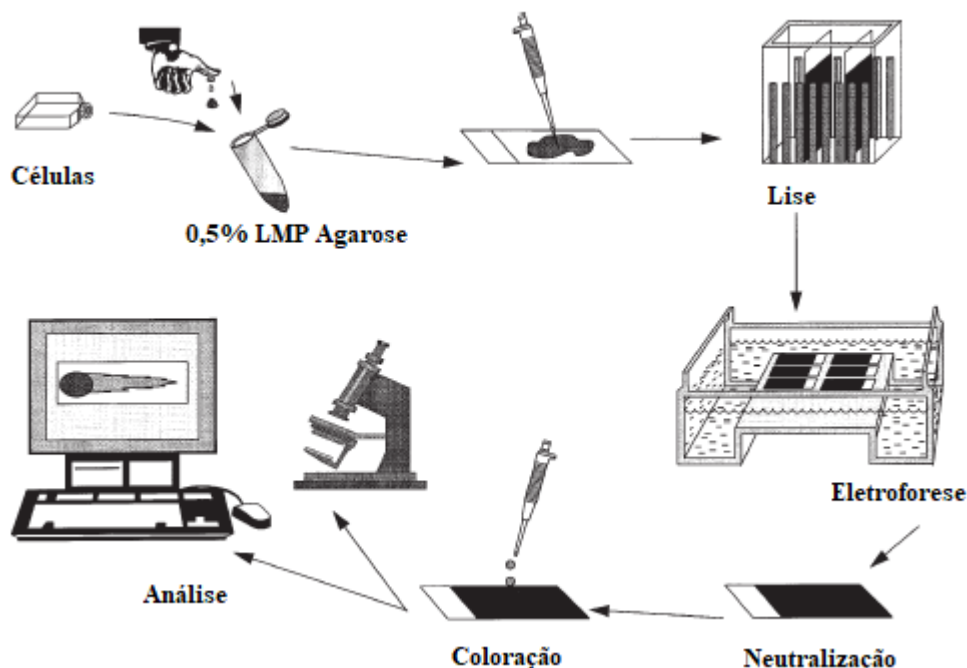


Figura 5. Esquema das etapas do ensaio cometa (Fonte: Adaptado de SPEIT & HARTMANN, 2006).

Apesar das condições neutras identificarem quebras de DNA de fita dupla, a metodologia proposta por Östling e Johanson não permitiu a detecção de quebras de fita simples, sendo que muitos agentes induzem cerca de 5 a 2.000 vezes mais quebras de fita simples do que de fita dupla. Dessa forma, o ensaio cometa em pH neutro limitou o uso desta metodologia, pois não se apresentou tão sensível quanto às condições alcalinas na detecção de danos ao DNA (SAROKIN; CARLSON, 1984; SINGH *et al.*, 1988).

A técnica do ensaio cometa foi aprimorada por Singh e colaboradores (1988), que atribuíram maior sensibilidade à técnica com a utilização de solução alcalina (pH>13). Em condições alcalinas, observa-se uma otimização na desnaturação do DNA e sua migração, permitindo um amplo espectro na detecção de danos ao DNA, ou seja, quebras de fita dupla e simples, bem como sítios alcalinos lábeis (SPEIT; HARTMANN, 2006).

Após as modificações no protocolo do ensaio cometa realizadas por Singh *et al.* (1988), houve um aumento significativo no uso desta técnica, pois o teste apresentou vantagens quando comparado a outros ensaios de genotoxicidade, como: sensibilidade na detecção de baixos níveis de danos ao DNA, o uso de um número pequeno de células por amostra, baixo custo, facilidade de aplicação, possibilidade de realização de estudos utilizando porções mínimas da substância em teste e curto período de tempo para a realização de um experimento (TICE *et al.*, 2000).

A visualização dos cometas é geralmente realizada em microscópio de fluorescência após a coloração com um corante fluorescente de ligação ao DNA (COLLINS, 2004). Os corantes mais usados são: brometo de etídio (EtBr), iodeto de propídio (PI), 4,6-diamidino-2-

fenilindol (DAPI), SYBR Green I e YOYO-1 (OSTLING; JOHANSON, 1984). O uso de corantes não fluorescentes, como o nitrato de prata, já foi relatado para a visualização de cometas (KIZILIAN *et al.*, 1999).

Conforme descrito por Collins (2004) existem distintas maneiras de analisar os cometas, levando em consideração o tamanho da cauda formada, por exemplo:

- 1) Com uso de programas computacionais específicos, ou seja, sistemas de análise de imagens são usados para quantificar o dano do DNA, levando em consideração alguns parâmetros, como: porcentagem de DNA na cauda, comprimento da cauda e o momento da cauda (porcentagem de DNA na cauda multiplicado pelo comprimento da cauda). Estes são os parâmetros mais utilizados, sendo a porcentagem de DNA na cauda caracterizado como o mais adequado.
- 2) Por score visual, onde os nucleoides são pontuados visualmente de acordo com o tamanho da cauda, sendo classificados conforme Kobayashi *et al.* (1995) em quatro classes como:
 - Classe 0 – não apresenta cauda (sem dano);
 - Classe 1 – cauda mais curta do que o diâmetro da cabeça (dano mínimo);
 - Classe 2 – cauda com tamanho até duas vezes maior que o diâmetro da cabeça (dano moderado);
 - Classe 3 – cauda com tamanho maior que duas vezes o diâmetro da cabeça (dano máximo).

A figura 6 ilustra as quatro classes de danos ao DNA descritas de acordo com a classificação visual.

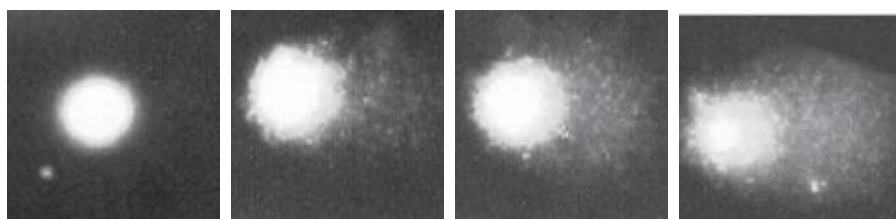
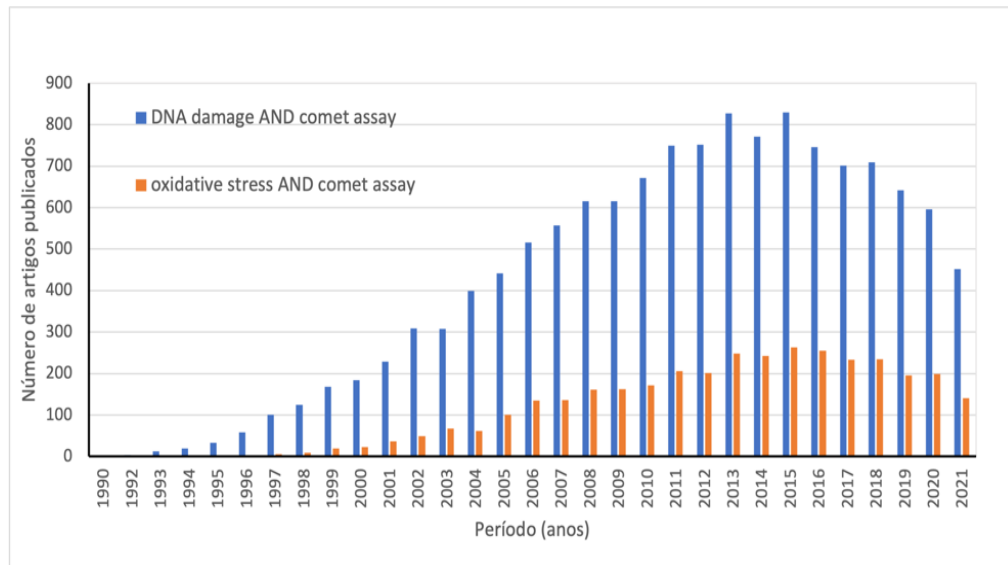


Figura 6. Classificação das classes de danos do DNA pelo ensaio cometa (Fonte: COLLINS, 2004).

De acordo com Afanasieva e Sivolob (2018), independentemente das condições neutras ou alcalinas para a eletroforese, o ensaio cometa difundiu rapidamente devido a sua simplicidade e disponibilidade, sendo desenvolvidas pesquisas para avaliação da atividade mutagênica de produtos químicos, fatores físicos, nanopartículas e drogas.

Resultados de uma pesquisa realizada no dia 20 de novembro de 2021, na base de dados Medline, via PubMed, utilizando os preditores “*dna damage AND comet assay*” revelaram que nas últimas três décadas foram publicados 13141 artigos, nos quais o ensaio cometa foi utilizado para avaliar danos no DNA. A média anual no período foi de 423,9 artigos publicados, sendo esta média superior a 700 trabalhos entre os anos de 2011 e 2018. Uma busca mais restrita, utilizando os preditores “*oxidative stress AND comet assay*” revelou uma curva de distribuição semelhante à da busca feita com os preditores mais abrangentes, tendo sido publicados 3558 artigos com esse enfoque desde 1990, com uma média anual de 114,7 artigos (Figura 7A). Esses números mostram que, desde que a técnica foi desenvolvida, cerca de 25% dos trabalhos realizados utilizando o ensaio cometa tinham como objetivo avaliar danos no DNA relacionados ao estresse oxidativo (Figura 7B), o que demonstra a relevância da técnica para os estudos nesta área.

A)



B)

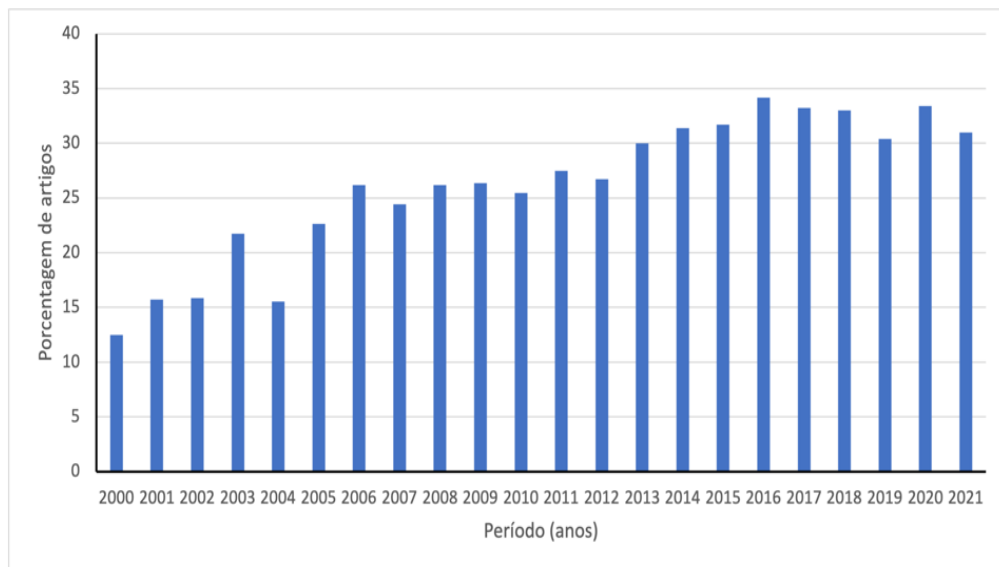


Figura 7. Levantamento dos artigos da base MedLine que utilizaram ensaio cometa nas três últimas décadas. A) Distribuição temporal dos artigos publicados entre os anos de 1990 e 2021 utilizando o preditores “DNA damage AND comet assay” e “oxidative stress AND comet assay”. B) Porcentagem dos artigos publicados anualmente entre os anos 2000 e 2021 obtida pela relação “oxidative stress AND comet assay”/“DNA damage AND comet assay”.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Considerando que o ácido fítico é um antioxidante natural, sendo sua ação atribuída a sua propriedade quelante de íons de ferro, inibindo a formação de radicais hidroxila, nosso estudo teve como objetivo avaliar a ação protetora do ácido fítico contra o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio sobre o DNA.

Hipótese: *O ácido fítico protege as células L929 contra o dano oxidativo ao DNA induzido pelo peróxido de hidrogênio.*

3.2 Objetivos Específicos

- Avaliar o efeito do ácido fítico sobre a viabilidade de células da linhagem L929;
Hipótese: *O ácido fítico não apresenta efeito citotóxico em células da linhagem L929.*
- Avaliar o efeito do peróxido de hidrogênio sobre a viabilidade de células da linhagem L929;

Hipótese: *O peróxido de hidrogênio em baixas concentrações apresenta baixa ação citotóxica sobre as células da linhagem L929.*

- Avaliar o efeito do ácido fítico sobre a viabilidade de células da linhagem L929 expostas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂);

Hipótese: *O ácido fítico exibe efeito protetor contra a citotoxicidade induzida pelo peróxido de hidrogênio em células da linhagem L929.*

- Avaliar o efeito genotóxico e antigenotóxico do ácido fítico em células L929 expostas ao H₂O₂.

Hipótese: *O ácido fítico não é genotóxico e exibe efeito protetor contra o dano ao DNA induzido pelo estresse oxidativo.*

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Agentes químicos e soluções

O ácido fítico ($C_6H_{18}O_{24}P_6 \cdot xNa^+ \cdot yH_2O$, Sigma-Aldrich, CAS n° 14306-25-3) foi diluído em meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM; Sigma-Aldrich, D5648). O peróxido de hidrogênio 35% (H_2O_2 ; ACS Científica, CAS n° 7722-84-1) foi diluído em solução salina (PBS) e foi usado como indutor de estresse oxidativo. Os outros produtos químicos foram obtidos dos seguintes fornecedores: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA; CAS n° 6381-92-6), dimetil sulfóxido (DMSO; CAS n° 67-68-5), tris hidroximetil aminometano (CAS n° 77-86-1), hidróxido de sódio (NaOH; CAS n° 1310-73-2), sulfato ferroso ($FeSO_4$; CAS n° 7782-63-0) e cloreto de sódio (NaCl; CAS n° 7647-14-5) foram adquiridos da Neon (São Paulo, Brasil). Agarose de ponto de fusão normal (NMP; CAS n° 9012-36-6), agarose de baixo ponto de fusão (LMP; CAS n° 39346-81-1), lauril sarcosinato de sódio (CAS n° 137-16-6), penicilina/estreptomicina, tripsina (CAS n° 9002-07-7) e N-acetil-L-cisteína (NAC; CAS n° 616-91-1) foram adquiridos da Sigma- Aldrich. O MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio) e a accutase foram adquiridos da Invitrogen, triton X-100 (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) e o soro bovino fetal (SBF; Cultilab, Brasil).

4.2 Cultivo celular

Neste estudo foi utilizada a linhagem de fibroblastos murinos (L929) cedida pelo Laboratório de Imunologia e Biologia Celular do Câncer e Leishmania (LaBICeL), do Departamento de Morfologia da Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão/SE. As células foram cultivadas em condições estéreis, em garrafas de poliestireno em meio Dulbeccos's Modified Eagle Medium (DMEM), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF) e 1% de antibiótico (penicilina e estreptomicina), sendo mantidas em estufa umidificada sob atmosfera de 37° C e 5% de CO_2 . O crescimento da cultura foi avaliado diariamente com auxílio do microscópio invertido, sendo pontuados na análise a morfologia, aderência e confluência das células. Após as células atingirem 80% de confluência, foram realizados repiques da cultura. Para cada passagem as células aderidas foram desprendidas da garrafa de cultura com uma solução de tripsina e EDTA (2,5 g/L de tripsina [1:250] e 0,38 g/L de EDTA em PBS) por três minutos a 37°C, seguidos da adição de meio DMEM suplementado a 10% com SBF para inativação da tripsina. As células em suspensão foram então transferidas para tubos e centrifugadas a 1200 rpm, a 4°C por 10 minutos. Após a centrifugação, o sobrenadante foi descartado e as células precipitadas (*pellet*) foram ressuspensas em meio DMEM completo. O subcultivo das células foi realizado durante toda a pesquisa, com a finalidade de manutenção da linhagem celular para a realização dos experimentos.

4.3 Avaliação da citotoxicidade em células L929

Para a determinação da citotoxicidade do ácido fítico e do peróxido de hidrogênio em células L929, foi usado o ensaio do MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil-tetrazólio), conforme descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações. Além disso, o ensaio do MTT foi também utilizado para avaliar o efeito citoprotetor do ácido fítico (AF) contra o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 em células de fibroblastos murinos.

4.3.1 Análise da viabilidade celular em resposta ao tratamento com ácido fítico

Para a avaliação da citotoxicidade do ácido fítico, células L929 foram semeadas em placa de 96 poços com uma densidade de 2×10^4 células por poço e incubadas por 24 horas em estufa a 37 °C e com 5% de CO_2 . Posteriormente, as células foram tratadas com 200µL de diferentes concentrações do AF (100; 50; 25; 12,5; 6,25; 3,125; 1,56; 0,78; 0,39 mM) diluídas em DMEM suplementado a 10% com SBF e a placa foi incubada nas mesmas condições descritas anteriormente. Como controle negativo, as células foram tratadas somente com meio DMEM suplementado com SBF a 10%. Após 24 horas de incubação, os tratamentos foram

removidos e, em seguida, foram adicionados aos poços 200 uL do reagente MTT (0,5 mg/mL diluído em tampão fosfato salino (PBS) estéril), incluindo os poços do controle negativo e a placa foi incubada a 37°C, 5% de CO₂ durante 3 h. Vale ressaltar que o MTT é fotossensível, assim desde o preparo até a adição nos poços, houve o cuidado de manter a solução de MTT no abrigo de luz.

Após a remoção do MTT dos poços foram adicionados 200 uL de dimetil sulfóxido (DMSO) para a solubilização dos cristais do sal formazan e a absorbância foi medida em espectrofotômetro (Synergy™ H1, BioTekHybrid Technology) com comprimento de onda de 570 nm. Como controle branco do teste foi usado o DMSO.

O percentual de viabilidade celular (%) V foi determinado de acordo com a seguinte fórmula:

$$(\%) V = \frac{\text{Absorbância (células tratadas)} - (\text{Absorbância branco})}{\text{Absorbância (controle negativo)} - (\text{Absorbância branco})} \times 100$$

4.3.2 Análise da viabilidade celular em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para este estudo, o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) foi escolhido como agente oxidante. Embora H₂O₂ seja amplamente utilizado para induzir efeitos genotóxicos em experimentos *in vitro*, faz necessário determinar em quais concentrações esta substância apresenta percentual mínimo de citotoxicidade para células L929. Para isso, as células L929 foram semeadas em placa de 96 poços (2 x 10⁴ células/poço) e incubadas em estufa a 37°C e 5% de CO₂ por 24h. Em seguida, as células foram expostas a diferentes concentrações do H₂O₂ diluído em PBS (750; 500; 250; 100; 75; 50 uM), sendo a placa envolvida em papel alumínio para proteger da ação da luz e incubada a 4°C por 30 minutos. Após decorrido esse tempo, removeram-se os tratamentos com H₂O₂ e foram adicionados 200uL do reagente de MTT (0,5 mg/mL) e a placa foi mantida a 37° C por 3 h. Os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO (200 uL) e absorbância foi medida a 570 nm em espectrofotômetro (Synergy™ H1, BioTekHybrid Technology). A porcentagem de sobrevivência celular foi calculada de acordo com a fórmula de viabilidade celular % (V) apresentada no item anterior (item 4.3.1).

4.3.3 Análise da ação do ácido fítico sobre a viabilidade de células L929 expostas ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Para avaliação do efeito citoprotetor do AF perante o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂, foram escolhidas três concentrações de AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM), as quais apresentaram percentual de sobrevivência celular superior a 70% de acordo com os resultados obtidos do teste de citotoxicidade do AF (item 4.3.1). Em relação ao H₂O₂, foi utilizada neste experimento a concentração de 75 uM, cujo tratamento também resultou em 70% de viabilidade celular. As células foram semeadas em placas de 96 poços (2x10⁴ células/poço) e após 24h de incubação a 37°C e 5% de CO₂, foram tratadas com o AF (1,56; 0,156; 0,0156 mM) por 24h, a 37°C e 5% de CO₂. Ao término do tempo de incubação, as células foram lavadas com PBS e expostas ao H₂O₂ (75uM), por 30 minutos a 4°C. Ao final do tratamento, a viabilidade celular foi determinada de acordo com o protocolo do ensaio MTT, conforme descrito anteriormente (item 4.3.1).

4.4 Atividade genotóxica e antigenotóxica

Para a determinação do potencial genotóxico e antigenotóxico do ácido fítico foram utilizadas duas metodologias distintas: o Ensaio Cometa e o Ensaio de Topologia do DNA plasmidial.

4.4.1 Ensaio Cometa

A versão alcalina do ensaio cometa foi realizada conforme descrito por Tice *et al.* (2000) com algumas modificações, sendo conduzido no Laboratório de Genética e Conservação de Recursos Naturais (GECON) da Universidade Federal de Sergipe. Todos os procedimentos metodológicos foram executados em ambiente com abrigo de luz e em baixa temperatura, com a finalidade de evitar possíveis danos adicionais ao DNA.

Aproximadamente 1×10^5 células foram semeadas em cada poço de uma placa de 12 poços e incubadas por 24 horas para aderência e proliferação celular. Para avaliação do efeito genotóxico do ácido fítico, as células foram expostas ao tratamento com três concentrações do AF (1,56; 0,156; 0,0156 mM) por 24 horas a 37°C, em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂. As concentrações usadas foram selecionadas com base nos resultados do ensaio do MTT (viabilidade celular maior que 70%).

Para avaliação do efeito antigenotóxico, as células foram expostas às mesmas concentrações de AF e a placa incubada na estufa a 37°C, em atmosfera enriquecida com 5% de CO₂ por 24 horas. Após o tratamento com AF, as células foram lavadas e expostas ao H₂O₂ 75 uM, por 30 minutos e a 4°C. Como controle positivo, as células foram expostas ao agente oxidante, H₂O₂ 75 uM, por 30 minutos a 4°C sem sofrer o tratamento prévio com o ácido fítico e como controle negativo as células foram mantidas em meio de cultivo sem nenhum dos tratamentos. Ao final dos tratamentos, as células foram submetidas ao processo de desprendimento do fundo do poço com adição de 300 uL de accutase. Uma vez em suspensão, as células foram colhidas em microtubos e centrifugadas a 1500 rpm, 4°C e por 10 minutos. Após a centrifugação, as células foram ressuspensas em 500 uL de PBS e submetidas ao protocolo do ensaio cometa.

Primeiramente, lâminas de microscopia foram pré-revestidas com uma fina camada de agarose de ponto de fusão normal (*normal melting point* ou NMP) a 1,5% (p/v). Uma alíquota de 20 uL da suspensão de células foi misturada a 120 uL de agarose de baixo ponto de fusão (*low melting point* ou LMP) a 1% (p/v). Cem microlitros da mistura das células com a agarose LMP foram depositadas sobre as lâminas de microscopia previamente revestidas com NMP, que em seguida foram cobertas com uma lamínula (24 x 32 mm) e incubadas a 4°C por 20 minutos para solidificação. Após esse período as lamínulas foram removidas e as lâminas contendo as duas camadas de agarose foram imersas durante 1 h a 4°C na solução de lise, que consiste em 89 mL de uma solução estoque (2,5 M NaCl, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, 10 g de lauril sarcosinato, 890 mL de água destilada e pH ajustado para 10,0 com 10 g de NaOH, 1 mL de Triton X-100 e 10 mL de DMSO).

Após o término do processo de lise, as lâminas foram transferidas para a cuba de eletroforese e cobertas com o tampão alcalino (NaOH 10 N e EDTA 200 mM, com pH > 13), onde as lâminas ficaram durante 20 minutos em repouso neste tampão para ocorrer a desnaturação do DNA. Posteriormente, ocorreu a eletroforese em banho de gelo (4°C) por 20 minutos a 25 Volts (V), 300 miliamperes (mA) e no abrigo da luz. Ao término da eletroforese, as lâminas foram submetidas ao processo de neutralização (solução de 0,4 M de Tris-HCl, pH 7,5) por 15 minutos. A fixação das lâminas foi realizada em etanol absoluto (100%) por 10 minutos e a secagem foi realizada por 24 horas em temperatura ambiente.

Para a coloração dos nucleoides, foram adicionados em cada lâmina 50 uL de iodeto de propídeo (50 ug/mL), sendo a lâmina recoberta por uma lamínula. A visualização dos nucleoides foi realizada em microscópio de fluorescência (ZEISS, Imager.M2), com a lente objetiva de 400x, filtro de excitação de 515 - 560 nm e uma barreira de filtro de 590 nm, sendo as imagens capturadas por uma câmera acoplada ao microscópio (AxioCam ICc 3). Para evitar qualquer análise tendenciosa durante a pesquisa, toda a área da lâmina foi observada realizando movimentos de “zigue-zangue”, bem como foram desconsiderados os nucleoides nas margens da lâmina, sobrepostos ou com aspecto de apoptose. Para a análise foram selecionados aleatoriamente uma média de 150 nucleoides.

A extensão do dano ao DNA foi avaliada pelo método quantitativo do momento da cauda, sendo os nucleoides analisados por score visual, como descrito por Collins (2004) e classificados em quatro classes: classe 0- sem cauda; classe 1 – cauda mais curta que o diâmetro da cabeça (núcleo); classe 2 – tamanho da cauda uma ou duas vezes maior do que o diâmetro da cabeça; e classe 3 – comprimento da cauda mais do que duas vezes o diâmetro da cabeça. Neste sentido, a pontuação total do cometa foi calculada pela seguinte equação: (% de células em classe 0 x 0) + (% de células em classe 1 x 1) + (% de células em classe 2 x 2) + (% de células em classe 3 x 3). A determinação do percentual de redução de dano (%R) nas concentrações do ácido fólico que apresentaram antigenotoxicidade foi calculada de acordo com Waters *et al.* (1990), com a seguinte fórmula:

$$(\%) R = \frac{\text{Média total (score A)} - \text{Média total (score B)}}{\text{Média total (score A)} - \text{Média total (score C)}} \times 100$$

Onde A é o controle positivo (H₂O₂ 75 uM), B é o tratamento do AF com H₂O₂ 75 uM e C é o controle negativo. Todos os experimentos foram realizados três vezes.

4.4.2 Ensaio de Topologia do DNA

Uma segunda metodologia para avaliação do efeito genotóxico e antigenotóxico do ácido fólico baseou-se na análise quantitativa das diferentes conformações estruturais do DNA plasmidial expostos aos produtos da reação de Fenton. Para isso, utilizou-se o protocolo descrito por Yeung *et al.* (2002).

Para avaliação genotóxica, em um tubo Eppendorf foi misturado 1,2 uL do DNA do plasmídeo pET28a (150 ng), 2 uL das concentrações de AF (1,56; 0,156 ou 0,0156 mM) e o volume final foi ajustado para 15 uL com PBS (pH 7,4), sendo posteriormente incubado em banho-maria a 37°C por 30 minutos.

A atividade antigenotóxica do AF foi avaliada incluindo os elementos da reação de Fenton (H₂O₂ e ferro). Para isso, 1,2 uL do DNA do plasmídeo pET 28a (150 ng) foram pré-tratados com 2 uL das concentrações de AF (1,56; 0,156 ou 0,0156 mM) por 10 minutos (37°C). Em seguida, foram adicionados 2 uL de sulfato ferroso (FeSO₄) a 100 uM e 2 uL de H₂O₂ (0,66%), sendo o volume final ajustado para 15 uL com PBS (pH 7,4). A reação foi incubada em banho-maria a 37°C por 30 minutos. Como controle positivo, o DNA do plasmídeo foi tratado somente com FeSO₄ a 100 uM e H₂O₂ (0,66%) e incubado nas mesmas condições descritas anteriormente.

Após a incubação, foram adicionados em cada tubo 2 uL de solução de azul de bromofenol 0,01% e as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de agarose (1,2%) em tampão tris/acetato/EDTA (TAE) 1x. Os parâmetros da eletroforese horizontal foram os seguintes: 100 V, 150 mA, 60 Watts (W) por 120 minutos. Ao final da eletroforese, o gel foi corado com uma solução de brometo de etídio (0,5 ug/mL) por 30 minutos, seguido por 10 minutos de descoloração em água. O gel foi fotografado sob luz ultravioleta (UV) e em seguida fotodocumentado pelo equipamento Gel doc L-pix HE (Loccus Biotecnologia, Brasil). As bandas do DNA foram quantificadas por meio do software ImageJ.

4.5 Análise estatística

Todos os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média (EPM) de três experimentos independentes, exceto nos experimentos do ensaio de topologia do DNA plasmidial, para o qual foram considerados dois experimentos.

A análise estatística dos dados foi realizada usando análise de variância (*one-way* ANOVA), seguido pelo teste de Dunnett, utilizando o software GraphPad Prism 8.0.1 (GraphPad Software, San Diego, CA, EUA). Os dados de (%) de redução de dano foram submetidos à ANOVA (*one-way*), seguido de pós-teste de Tukey.

Os resultados que obtiveram níveis de significância ($p < 0,05$), quando comparados com o controle negativo ou controle positivo, foram considerados estatisticamente significativos.

5. RESULTADOS

5.1 Análise da viabilidade celular em resposta ao tratamento com ácido fítico

A determinação da citotoxicidade do ácido fítico para células de fibroblastos murinos (L929) foi realizada pelo ensaio colorimétrico do MTT. Conforme mostrado na figura 8, pode-se observar que após 24 horas de exposição, o AF nas três menores concentrações avaliadas 1,56, 0,78 e 0,39 mM não causou nenhum efeito significativo na viabilidade celular de L929, ou seja, estas concentrações não apresentaram efeitos citotóxicos, sendo os percentuais de viabilidade celular observados nestes tratamentos iguais a 74,13%, 89,97% e 115,92%, respectivamente.

Entretanto, para as concentrações de AF de 100; 50; 25; 12,5; 6,25 e 3,12 mM), foi possível observar uma diminuição significativa na viabilidade celular, quando comparado ao controle negativo (CN). Diante disso, ficou definido por trabalhar com concentrações iguais e inferiores a 1,56 mM nos experimentos posteriores, por apresentarem percentual de células viáveis acima de 70%.

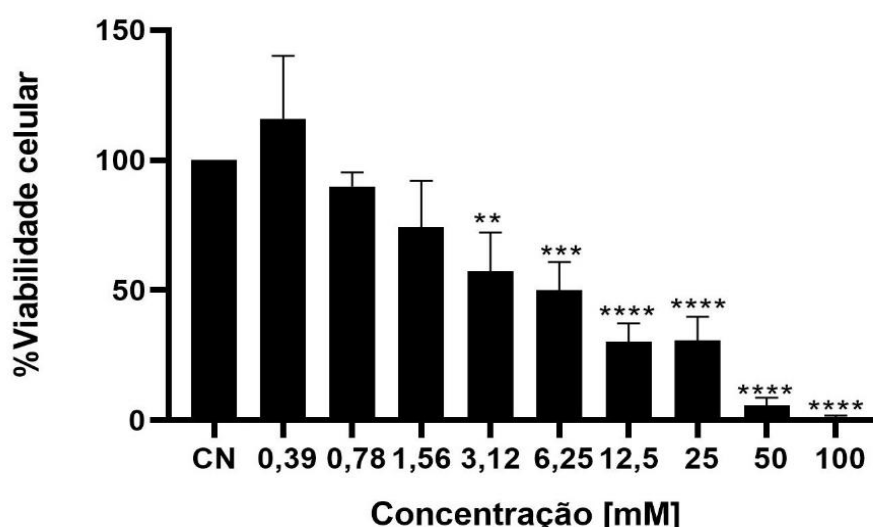


Figura 8. Porcentagem de fibroblastos murinos (L929) viáveis após 24h de exposição a diferentes concentrações do ácido fítico (mM), avaliado pelo teste do MTT. Os resultados são expressos como a média \pm EPM de três experimentos independentes. Foi realizada a análise de variância unilateral (ANOVA) e teste de Dunnett, sendo considerado estatisticamente diferente quando: ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$), comparado ao controle negativo.

5.2 Análise da viabilidade celular em resposta ao tratamento com peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

O ensaio do MTT foi usado para a determinação do efeito de diferentes concentrações do H₂O₂ na viabilidade de células L929. Vale ressaltar que o objetivo foi selecionar uma concentração do H₂O₂ capaz de promover uma citotoxicidade mínima para as células, porém que seja capaz de induzir o estresse oxidativo.

Como mostrado na figura 9, pode-se observar que em todas as concentrações testadas do H₂O₂ foi revelada uma citotoxicidade para as células L929. Entretanto, para as concentrações do H₂O₂ de 15, 50 e 75 μ M, foi obtida uma viabilidade celular \geq 70%. De acordo com os resultados obtidos, foi constatado que à medida em que a concentração do H₂O₂ aumenta, ocorre uma diminuição na viabilidade das células L929, quando comparamos ao controle negativo.

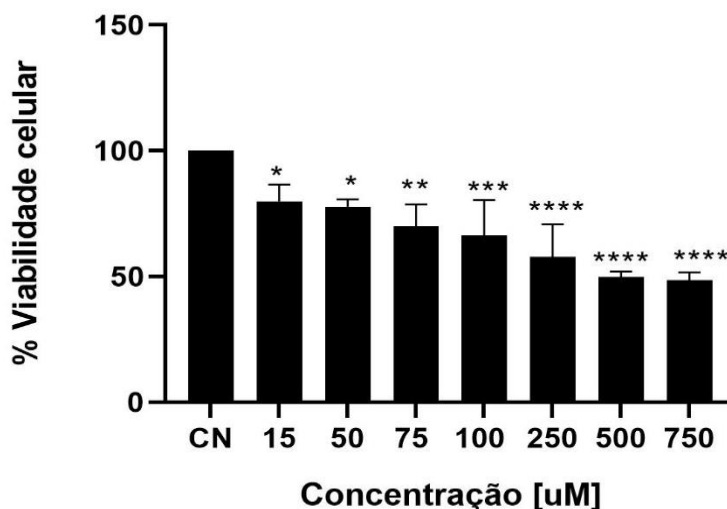


Figura 9. Porcentagem de fibroblastos murinos (L929) viáveis após 40 minutos de exposição a diferentes concentrações do peróxido de hidrogênio, avaliado pelo teste do MTT. Os resultados são expressos como a média \pm EPM de três experimentos independentes. Foi realizada a análise de variância unilateral (ANOVA) e teste de Dunnett, sendo considerado estatisticamente diferente quando: * ($p < 0,1$), ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$), **** ($p < 0,0001$), comparado ao controle negativo.

5.3 Avaliação do efeito do ácido fítico sobre a viabilidade de células expostas ao peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

Para avaliar se o pré-tratamento das células L929 com ácido fítico apresenta capacidade de protegê-las da citotoxicidade induzida pelo H_2O_2 , foi utilizado o ensaio do MTT. Inicialmente, foram selecionadas três concentrações não citotóxicas de AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM), sendo as células pré-tratadas com estas concentrações do AF por 24 horas, seguida da exposição ao H_2O_2 75uM durante 30 minutos.

De acordo com a figura 10, os resultados demonstraram que o pré-tratamento das células L929 com as concentrações de AF de 0,0156 e 0,156 mM exibiram efeitos citoprotetores contra a toxicidade induzida pelo H_2O_2 75uM, resultando em um aumento significativo na viabilidade celular quando comparado ao tratamento das células somente com H_2O_2 75uM ($114,50\% \pm 9,39$ vs. $69,94\% \pm 5,06$) e ($122,49 \pm 0,46$ vs. $69,94\% \pm 5,06$), respectivamente.

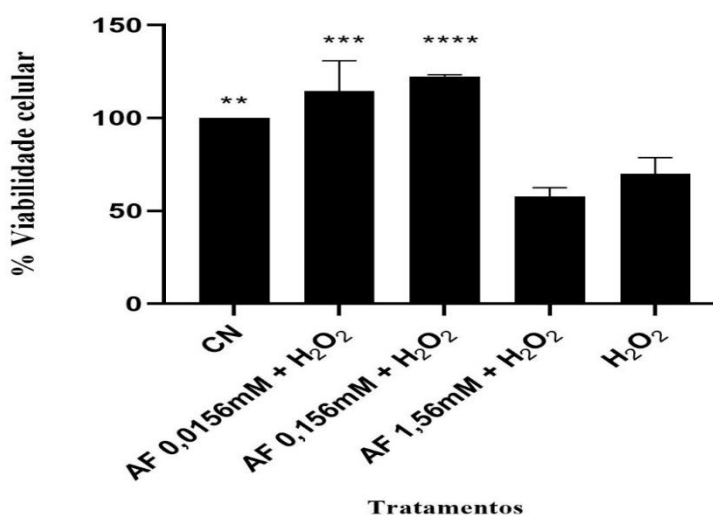


Figura 10. Porcentagem de fibroblastos murinos (L929) viáveis após o pré-tratamento com AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM) por 24h, seguido da exposição ao H_2O_2 75 uM por 30 minutos, avaliado pelo teste do MTT. Os resultados são expressos como a média \pm EPM de três

experimentos independentes. Foi realizada a análise de variância unilateral (ANOVA) e teste de Dunnett, sendo considerado estatisticamente diferente quando: ** ($p < 0,01$), *** ($p < 0,001$) e **** ($p < 0,0001$), comparado ao controle positivo (H_2O_2 75 μM).

Por outro lado, não foi possível evidenciar um efeito protetor do pré-tratamento das células com a concentração de AF 1,56 mM por 24 horas, seguido da exposição ao H_2O_2 75 μM , ou seja, a ação do AF foi suprimida em resposta a 75 μM de H_2O_2 , inibindo significativamente a viabilidade das células L929 ($57,67\% \pm 2,79$ vs. $69,94\% \pm 5,06$) e não diferiu estatisticamente do controle positivo (H_2O_2 75 μM).

5.4 Avaliação da atividade genotóxica e antigenotóxica do ácido fítico

5.4.1 Ensaio Cometa

O ensaio cometa foi utilizado para avaliar se o tratamento com ácido fítico era capaz de proteger as células contra os danos primários no DNA induzidos por estresse oxidativo, bem como para avaliar se o próprio AF poderia induzir danos genotóxicos. Para isso, baseado na avaliação da citotoxicidade do AF, foram escolhidas as concentrações de 1,56 mM, 0,156 mM e 0,0156 mM para avaliar a propriedade genotóxica e antigenotóxica do AF.

Os resultados obtidos para avaliação da genotoxicidade são mostrados na tabela 2. Na análise do potencial genotóxico do AF, é possível observar que para todas as concentrações testadas de AF não houve aumento na migração do DNA, ou seja, pode-se notar que não houve diferença significativa quando comparamos os tratamentos das diferentes concentrações de AF com o controle negativo ($p < 0,01$). Diante disso, pode-se inferir que nas concentrações testadas o AF não apresentou efeitos genotóxicos e, conseqüentemente, não tem a capacidade de induzir quebras no DNA.

Vale ressaltar que, embora não apresente diferença estatisticamente significativa entre o controle negativo e o tratamento com AF, nota-se que em relação a todos os parâmetros avaliados (classes de dano e score), houve uma redução do nível basal de danos primários ao DNA para todas as concentrações testadas do AF, quando comparamos ao controle negativo. Dessa forma, pode-se inferir que além de não causar genotoxicidade para células, o AF é capaz de protegê-las contra as EROs, que são formadas como produto do metabolismo natural das células.

Como controle antioxidante para nossos experimentos foi escolhido o N-acetil-L-cisteína (NAC). Verificou-se que não há distinção entre o grupo controle e o tratamento das células com o NAC 1,5 mM por 24 horas, demonstrando assim que o NAC não apresenta efeitos genotóxicos para as células L929. Além disso, os resultados também mostraram que a redução causada no score e na quantidade de células danificadas para todas as classes de dano pelos tratamentos com AF foi maior (apesar de não significativa estatisticamente) que a redução causada pelo NAC. Assim, foi possível evidenciar que o tratamento com todas as concentrações de AF apresenta uma maior eficiência na proteção de danos primários ao DNA que o tratamento com o controle antioxidante para as células L929.

Tabela 2. Migração do DNA (média \pm EPM) para avaliação da genotoxicidade do ácido fítico (AF) em células da linhagem L929, com base nas classes de danos observadas.

Tratamentos	Classe de Dano				Scores (1-3)
	0	1	2	3	
CN	95,71 \pm 1,56	2,33 \pm 1,19	1,03 \pm 0,41	0,92 \pm 0,53	7,16 \pm 2,60
H ₂ O ₂ 75 uM	46,25 \pm 8,46 ^a	26,49 \pm 3,95 ^a	22,72 \pm 7,63 ^b	4,52 \pm 1,21 ^b	85,5 \pm 17,84 ^a
AF 1,56 mM	99,64 \pm 0,36	0 \pm 0	0,18 \pm 0,18	0,18 \pm 0,18	0,89 \pm 0,89
AF 0,156 mM	99,3 \pm 0,44	0,53 \pm 0,29	0 \pm 0	0,17 \pm 0,17	1,04 \pm 0,77
AF 0,0156 mM	99,39 \pm 0,60	0,12 \pm 0,12	0,36 \pm 0,36	0,12 \pm 0,12	1,20 \pm 1,20
NAC 1,5 mM	97,08 \pm 2,38	1,14 \pm 1,14	0,85 \pm 0,85	0,92 \pm 0,39	5,62 \pm 4,02

Os dados são apresentados como médias \pm EPM de três experimentos independentes. Foi realizada a análise de variância unilateral (ANOVA) e teste de Dunnett, sendo considerado estatisticamente diferente do controle negativo: ^a($p < 0,0001$) e ^b($p < 0,01$). CN = Controle Negativo. AF = Ácido fítico. NAC = N-acetil-L-cisteína.

Para a determinação do efeito antigenotóxico do ácido fítico, as células L929 foram inicialmente pré-tratadas com concentrações do AF consideradas não citotóxicas e não genotóxicas (1,56; 0,156 e 0,0156 mM) por 24 horas, seguida da exposição ao agente oxidativo (H₂O₂ 75 uM) por 30 minutos.

Conforme mostrado na tabela 3, os resultados obtidos referente ao potencial antigenotóxico indicaram que o pré-tratamento das células L929 com todas as concentrações de AF reduziram significativamente o número de células com dano de DNA induzido pelo H₂O₂ 75 uM, sendo observado que mesmo após a indução do estresse oxidativo, a maioria dos cometas apresentaram-se em classe 0 (sem dano). Dessa forma, foi demonstrado que o pré-tratamento com as três concentrações de AF apresentou um efeito protetor contra o dano induzido pelo agente oxidativo, atenuando significativamente as lesões ao DNA quando comparado ao controle positivo ($p < 0,05$).

Vale ressaltar que, em comparação aos grupos do pré-tratamento das células L929 nas três concentrações de AF testadas, seguida da exposição ao H₂O₂, é possível observar que não houve diferença significativa em relação ao controle negativo.

Embora todas as concentrações de AF tenham demonstrado uma eficiência na proteção de danos induzidos pelo H₂O₂, é notório que para todos os parâmetros avaliados (score e classes de danos) a concentração de 0,156 mM do AF exibiu a atenuação mais proeminente de danos ao DNA, quando comparado ao controle positivo (score de 8,65 \pm 6,19 vs 85,5 \pm 17,84) e ao pré-tratamento com NAC 1,5 mM, seguido da exposição das células ao H₂O₂ 75 uM por 30 minutos (score de 8,65 \pm 6,19 vs 16,42 \pm 6,82), respectivamente. Os resultados demonstraram notavelmente o potencial genoprotetor do AF contra os efeitos genotóxicos provocados pelo H₂O₂ em células de fibroblastos murino.

Tabela 3. Migração do DNA (média \pm EPM) para avaliação da antigenotoxicidade do ácido fítico (AF) em células da linhagem L929, com base nas classes de danos observadas.

Tratamentos	Classe de Dano				Scores (1-3)
	0	1	2	3	
CN	95,71 \pm 1,56 ^b	2,33 \pm 1,19 ^b	1,03 \pm 0,41 ^b	0,92 \pm 0,53	7,16 \pm 2,60 ^b
H ₂ O ₂	46,25 \pm 8,46 ^a	26,49 \pm 3,95 ^a	22,72 \pm 7,63 ^a	4,52 \pm 1,21	85,5 \pm 17,84 ^a
AF [1,56 mM] + H ₂ O ₂	84,68 \pm 9,30 ^b	7,90 \pm 5,40 ^b	4,36 \pm 2,64 ^b	3,04 \pm 1,47	25,76 \pm 14,64 ^b
AF [0,156 mM] + H ₂ O ₂	94,59 \pm 4,14 ^b	2,75 \pm 2,49 ^b	2,04 \pm 1,32 ^b	0,60 \pm 0,37	8,65 \pm 6,19 ^b
AF 0,0156 mM + H ₂ O ₂	90,80 \pm 6,44 ^b	3,18 \pm 2,16 ^b	4,56 \pm 3,16 ^b	1,45 \pm 1,16	16,66 \pm 11,91 ^b
NAC 1,5 mM + H ₂ O ₂	88,88 \pm 6,32 ^b	6,92 \pm 5,91 ^b	3,07 \pm 0,34 ^b	1,11 \pm 0,24	16,42 \pm 6,82 ^b

Os dados são apresentados como médias \pm EPM de três experimentos independentes. Análise de variância unilateral (ANOVA) e teste de Dunnett estatisticamente diferente: ^a($p < 0,05$) quando comparado ao controle negativo e ^b($p < 0,05$) quando comparado ao controle positivo (H₂O₂ 75 μ M por 30 minutos). CN = Controle Negativo. AF = Ácido fítico. NAC = N-acetil-L-cisteína.

Para todos os tratamentos com AF foi possível identificar um percentual de redução de dano (%R) superior a 70% (Figura 11). Entretanto, o aumento na concentração do AF não está correlacionado a uma maior redução de lesões oxidativas ao DNA, sendo o maior percentual de redução observado na concentração de AF 0,156 mM (96,93%), seguida respectivamente do tratamento com AF 0,0156 mM (85,64%) e AF 1,56 mM (75,84%). Já para o tratamento com NAC 1,5 mM, a porcentagem de redução foi similar a menor concentração de AF, correspondendo a 89,98%.

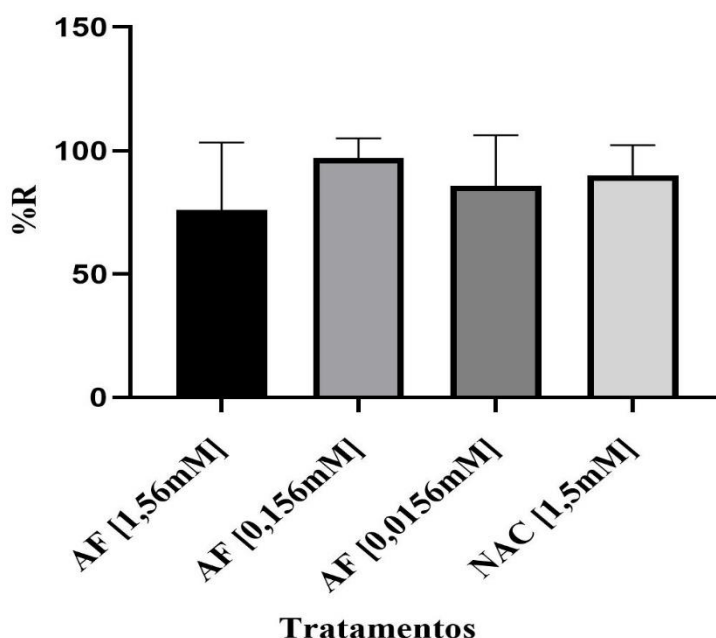


Figura 11. Efeito do ácido fítico na redução de dano (%R) ao DNA induzido pelo H₂O₂ 75 μ M. Os dados são apresentados como médias \pm EPM de três experimentos independentes. Foi realizada a análise de variância unilateral (ANOVA), seguido do pós-teste de Tukey, sendo considerado estatisticamente diferente do controle negativo ($p > 0,05$).

Conforme mostrado na figura 12, pode-se observar que o padrão de migração dos nucleoides para os grupos pré-tratados com AF, seguida da indução do dano oxidativo com H_2O_2 (Figura 12 – C, D e E), foi semelhante ao grupo do controle negativo (Figura 12A). Além disso, foi possível também constatar uma redução significativa na migração do DNA das células L929 para qualquer uma das concentrações de AF avaliadas em comparação ao grupo de células tratadas somente com H_2O_2 75 μ M (Figura 12B). Esses resultados mostraram evidentemente que o AF protegeu o DNA contra o dano induzido pelo peróxido de hidrogênio.

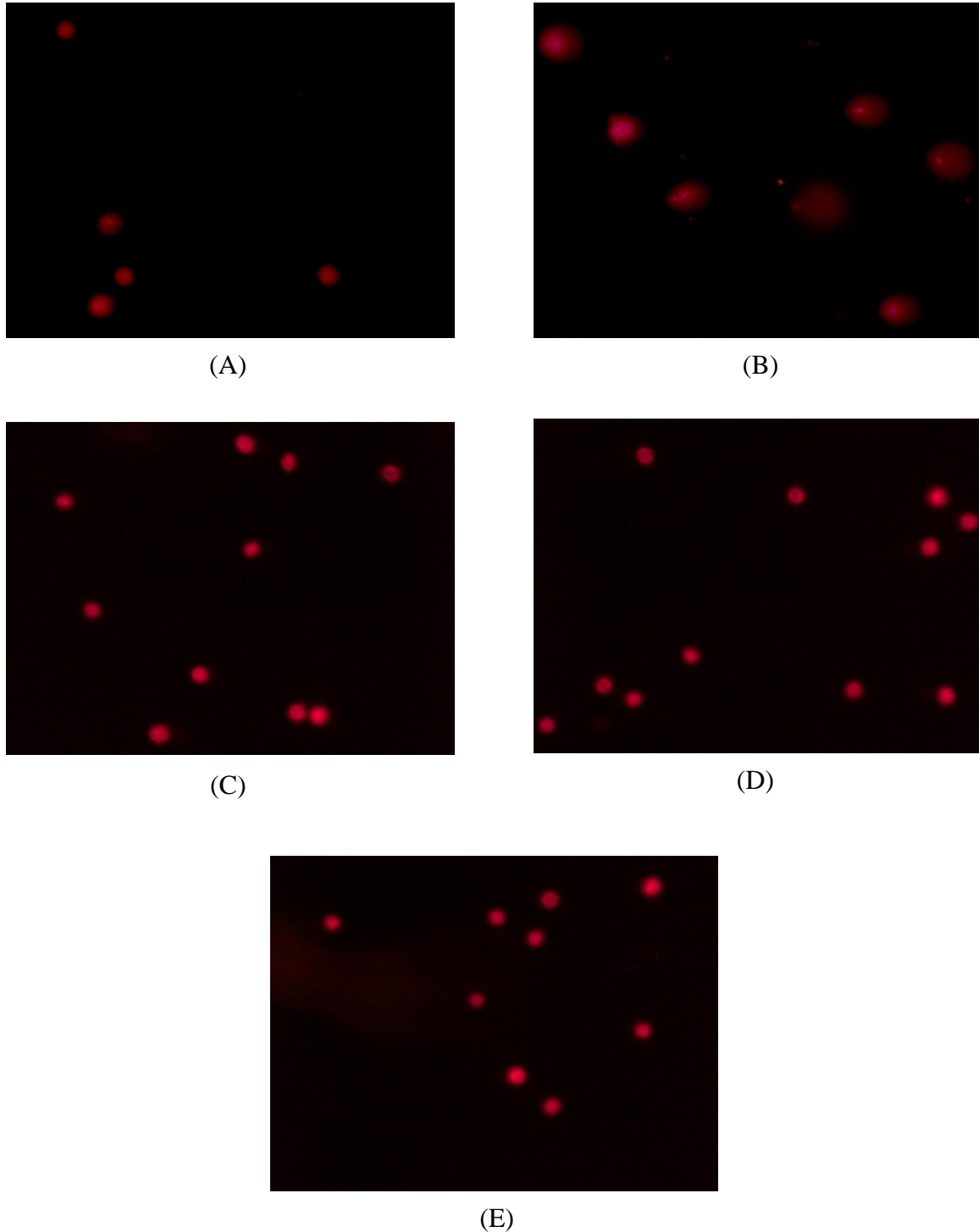


Figura 12. Fotomicrografia do ensaio cometa para detecção de danos no DNA de células L929 pré-tratadas com diferentes concentrações de ácido fítico, seguida da exposição ao H_2O_2 75 μ M. (A) Controle negativo (células expostas somente ao meio DMEM); (B) Controle Positivo (células expostas somente ao H_2O_2 75 μ M por 30 minutos); (C) Células pré-tratadas

com AF 1,56 mM + H₂O₂ 75 uM; (D) Células pré-tratadas com AF 0,156 mM + H₂O₂ 75 uM; (E) Células pré-tratadas com AF 0,0156 mM + H₂O₂ 75 uM.

5.4.2 Ensaio de Topologia do DNA

Com o objetivo de avaliar se o ácido fítico tem ação de proteger o DNA contra danos causados por radicais hidroxila produzidos via reação de Fenton, utilizou-se um sistema livre de células baseado na análise das formas topológicas do DNA plasmidial exposto ao FeSO₄ e H₂O₂. Conforme mostrado na figura 13, em sua forma original, o DNA encontra-se em uma formação compacta superenrolada - *supercoil* (a), por isso a sua mobilidade no gel de agarose durante a corrida eletroforética é muito rápida. Quando ocorre a clivagem em uma das fitas, a estrutura superenrolada do DNA é afetada e resulta na forma do DNA circular relaxado (b), cuja mobilidade no gel é diminuída. Pode -se observar ainda a forma linear quando ocorre a quebra de fita dupla (c), resultando em uma mobilidade média entre as formas *supercoil* e circular (RYBKOVÁ *et al.*, 2016).



Figura 13. Conformações estruturais do DNA do plasmídeo. a) Forma superenrolada (*supercoil*). b) Forma circular relaxada (quebra de fita simples). c) Forma linear (quebra de fita dupla). d) Representação do posicionamento das bandas na corrida eletroforética (Fonte: Adaptado de VERGER *et al.*, 2021).

A figura 14 mostra o padrão de bandas obtidas após o tratamento do plasmídeo pET28a com AF seguido ou não da exposição à reação Fenton. Visualmente foi evidenciado que, nas concentrações testadas, o tratamento com AF sem a exposição posterior à reação de Fenton não afetou a conformação compacta superenrolada do DNA, sendo observado um padrão de bandas na forma *supercoil* semelhante ao controle negativo, conforme visto nas pistas 3, 4 e 5.

De acordo com os resultados obtidos pela quantificação das bandas foi possível observar que não houve diferença significativa para o percentual de DNA na forma superenrolada (íntegra), quando comparado ao controle de DNA (Figura 15). Assim, pode-se inferir que nas concentrações testadas o AF não apresentou genotoxicidade para o DNA plasmidial.

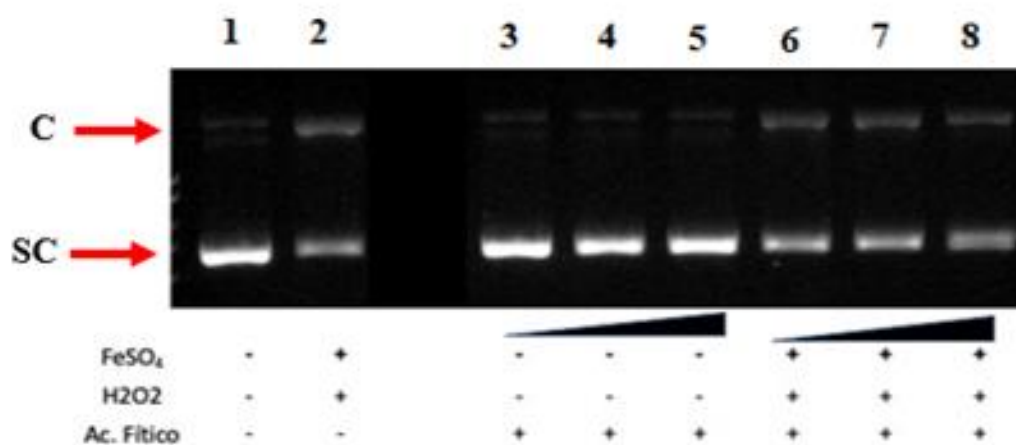


Figura 14. Padrão eletroforético do plasmídeo pET28a no tratamento com ácido fítico. Pista 1: controle de DNA; Pista 2: DNA tratado com FeSO₄ + H₂O₂; Pista 3: DNA tratado com AF 0,0156 mM; Pista 4: DNA tratado com AF 0,156 mM; Pista 5: DNA tratado com AF 1,56 mM;

Pista 6: DNA tratado com AF 0,0156 mM + FeSO₄ + H₂O₂ ; Pista 7: DNA tratado com AF 0,156 mM + FeSO₄ + H₂O₂; Pista 8: DNA tratado com AF 1,56 mM + FeSO₄ + H₂O₂.

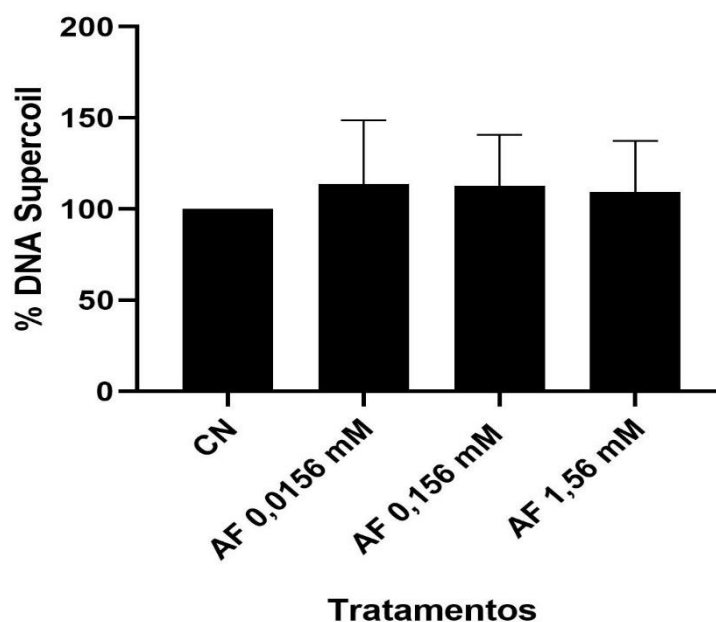


Figura 15. Porcentagem de DNA do plasmídeo pET 28a na forma *supercoil* (superenrolada) após o tratamento com AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM) por 30 minutos. Os resultados são expressos como a média ± EPM de dois experimentos independentes. Foi realizada a análise de variância unilateral (ANOVA) e teste de Dunnett, sendo considerado estatisticamente diferente quando comparado ao controle negativo. CN = Controle de DNA.

Ainda de acordo com a figura 14 (pistas 2, 6, 7 e 8), é possível visualizar que o padrão eletroforético do DNA do plasmídeo pET 28a exposto à reação de Fenton exibiu duas bandas na eletroforese, correspondendo ao DNA na forma superenrolada e a outra banda com o DNA na conformação circular relaxado. No entanto, é possível identificar no padrão da banda do *supercoil* do DNA pré-tratado com as três concentrações do AF, seguido da exposição ao FeSO₄ + H₂O₂ (pistas 6, 7 e 8), uma quantidade ligeiramente maior de DNA nesta banda, quando comparado ao DNA plasmidial tratado somente com FeSO₄ + H₂O₂ (pista 2).

Pela quantificação das bandas formadas na corrida eletroforética, pode-se observar que o percentual de DNA na conformação *supercoil* no pré-tratamento das três concentrações de AF, seguido da exposição ao FeSO₄ + H₂O₂, apresentou-se maior que o tratamento do DNA exposto somente ao FeSO₄ + H₂O₂ (controle positivo). Entretanto, essa diferença não foi estatisticamente significativa (Figura 16).

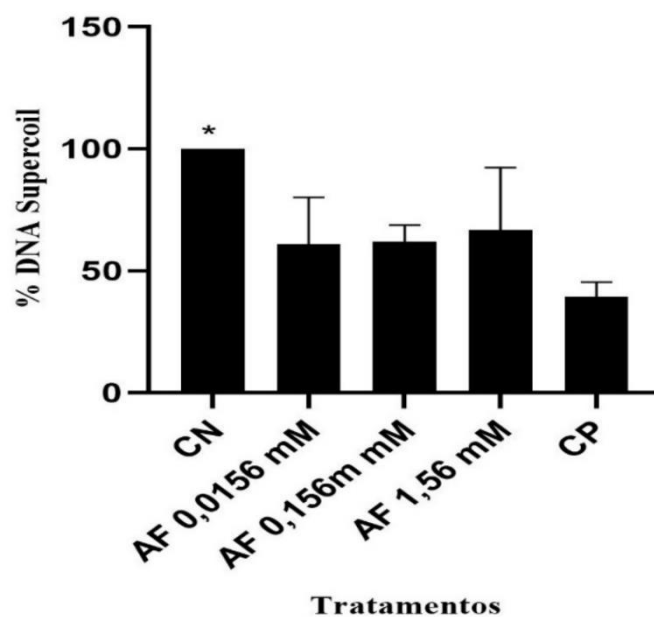


Figura 16. Percentual de DNA pET 28a nas formas *supercoil* após o pré-tratamento com AF (1,56; 0,156 e 0,0156 mM), seguido da exposição ao $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$ por 30 minutos. Os resultados são expressos como a média \pm EPM de dois experimentos independentes. Foi realizada a análise de variância unilateral (ANOVA) e teste de Dunnett, sendo considerado estatisticamente diferente quando $p < 0,01$, comparado ao controle positivo (DNA somente tratado com $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$). CN = Controle de DNA; CP = DNA tratado somente com $\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$.

6. DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, numerosos estudos têm buscado identificar fitoquímicos que exibem um papel protetor contra danos ao material genético. Na literatura, os fitoquímicos são caracterizados como metabólitos secundários de ocorrência natural que podem apresentar uma potente atividade biológica (LEE *et al.*, 2012; LÓPEZ-ROMERO *et al.*, 2018). Os fitoquímicos dietéticos são considerados como suplementos alimentares, pois fornecem nutrientes como vitaminas, minerais, fibras, ácidos graxos e aminoácidos (PISOSCHI e POP, 2015).

O ácido fítico (AF) ou hexafosfato de inositol (IP6) é um fitoquímico encontrado principalmente em alimentos com alto teor de fibras (PLAAMI, 1997). Dentre todos os fosfatos de inositol, o IP6 é a forma mais abundante, sendo moléculas ubíquas que desempenham uma série de papéis importantes nas vias metabólicas celulares e na transdução de sinal, que incluem: proliferação e diferenciação celular, exportação de RNA, reparo de DNA, transdução de energia, regeneração de ATP e muitos outros (WEINBERG *et al.*, 2021).

Apesar de ser considerado um antinutriente, devido a sua capacidade de quelar íons metálicos multivalentes, limitando sua biodisponibilidade, diversos estudos apontam que essa mesma propriedade quelante também confere muitos benefícios à saúde humana. A propriedade antioxidante do ácido fítico, por exemplo, que é bem descrita e comprovada em vários trabalhos científicos, é atribuída a sua forte capacidade quelante de íons metálicos (SILVA e BRACARENSE, 2016). Dessa forma, essas propriedades benéficas potencializam o uso do ácido fítico para aplicações em muitas outras áreas (FEIZOLLAHI *et al.*, 2021; OMORUYI *et al.*, 2013; SINGH; AGARWAL, 2005).

Neste sentido, o presente estudo objetivou avaliar as atividades citoprotetora e genoprotetora de diferentes concentrações do ácido fítico contra o dano induzido ao DNA pelo peróxido de hidrogênio em células de fibroblastos murino (L929).

Para nossos estudos de citotoxicidade, genotoxicidade e antígenotoxicidade, utilizamos o sistema *in vitro* por ser considerado uma ferramenta simples e com protocolos confiáveis. Além disso, o modelo *in vitro* apresenta vantagens em comparação ao sistema *in vivo*, pois permite o delineamento experimental para limitar o número de variáveis experimentais, a fácil padronização dos ensaios, o controle e manipulação das condições experimentais (pH, temperatura, composição do meio de cultura e condições assépticas), a rápida obtenção de resultados significativos, uma boa reprodutividade, além de requerer custos operacionais e de infraestrutura mais acessíveis (LEWINSKA *et al.*, 2007; ROGERO *et al.*, 2003; ZUCCO *et al.*, 2004). Sendo assim, a linhagem de fibroblastos murinos L929 foi utilizada neste trabalho devido a estudos anteriores que relataram que esta linhagem é caracterizada por ser um bom modelo para avaliar a sobrevivência e as respostas oxidativas em sistemas biológicos (LUNA-LÓPEZ *et al.*, 2010; MENDOZA-MILLA *et al.*, 2005).

Os primeiros experimentos deste estudo tiveram como objetivo estabelecer as concentrações não citotóxicas do AF em células L929 e que, portanto, pudessem ser posteriormente usadas para avaliação da antígenotoxicidade do AF. De acordo com Gonçalves (2018), os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são ferramentas essenciais para a determinação da ação de compostos, isolados ou em misturas, sobre a viabilidade celular, com destaque para o ensaio colorimétrico do MTT.

Dessa forma, para avaliar o efeito do AF sobre a viabilidade de células L929, foi utilizado o ensaio do MTT de acordo com o protocolo desenvolvido por Mosmann (1983), porém com algumas alterações. O ensaio do MTT caracteriza-se por ser um método colorimétrico, versátil, rápido, simples, quantitativo e aplicável para muitas linhagens celulares, sendo baseado na capacidade de células metabolicamente ativas de converter o sal tetrazólio (cor amarela) em um sal insolúvel de cor roxa (formazan), pela ação da enzima succinato-desidrogenase (BURANAAMNUAY, 2021). Devido à formação do produto ser um sal insolúvel, para dissolver os cristais de formazan é utilizado um solvente, sendo o dimetilsulfóxido (DMSO) em concentração absoluta o solvente mais eficaz para a solubilização

do formazan e indicado para culturas de células aderentes (NGA *et al.*, 2020; TWENTYMAN; LUSCOMBE, 1987). A quantificação dos cristais de formazan é feita em espectrofotômetro com comprimento de onda de 550 – 600 nm, de modo que a quantidade de formazan convertido é proporcional ao número de células viáveis.

Os resultados obtidos neste estudo demonstraram que concentrações do AF inferiores a 1,56 mM não apresentaram citotoxicidade para células L929 e revelaram um percentual de viabilidade celular superior a 70%, após 24 horas de tratamento. Com base nestes resultados, foram selecionadas as concentrações de AF 1,56; 0,156 e 0,0156 mM para avaliação dos efeitos anticitotóxico, genotóxico e antigenotóxico. Embora os dados não tenham sido mostrados, foi realizado um ensaio prévio da citotoxicidade para as concentrações de AF 0,156 mM e 0,0156 mM em células L929 por 24 horas, no qual observou-se um percentual de viabilidade celular de 128,83% e 135,40%, respectivamente. Diante desses resultados, pode-se inferir que a viabilidade celular acima de 100% nas células tratadas com AF, em comparação ao controle negativo, seja um indicativo de que concentrações mais baixas de AF, além de não serem citotóxicas, estimulam a proliferação celular.

Resultados compatíveis a este estudo foram identificados por Windhorst e colaboradores (2013), os quais observaram que baixas concentrações de IP6 (1 - 75 uM) no meio de cultura estimularam significativamente a proliferação de células tumorais de pulmão (H1299), porém na maior concentração testada de IP6 (100 uM), eles identificaram um efeito inibitório no crescimento celular. Como argumento para explicar essas divergências no efeito de diferentes concentrações do IP6 sobre a proliferação celular, esses autores atribuíram o fato de que somente 20% do IP6 extracelular é endocitado pelas células, e após sua absorção ocorre o processo de desfosforilação sendo o IP6 transformado em IP3, o qual é em seguida reduzido a inositol. Assim, o aumento nas concentrações intracelulares de inositol de formas desfosforiladas de IP, associado à disponibilização dos íons metálicos liberados durante a desfosforilação seriam os responsáveis pelo estímulo na proliferação celular. Por outro lado, quando presente no meio de cultivo em altas concentrações, o excesso de IP6 extracelular permanece associado ao glicocálice, formando complexos com cátions multivalentes, como Ca^{2+} , Mg^{2+} , Zn^{2+} e Fe^{3+} , que estão disponíveis no meio de cultura, o que, conseqüentemente, torna estes íons bivalentes e trivalentes indisponíveis para as células, levando a inibição da proliferação celular.

Estudos anteriores já haviam demonstrado o papel do inositol como fator estimulatório da proliferação celular. Eagle *et al.* (1956) avaliaram a ação do mio-inositol, molécula precursora do ácido fólico, em dezoito linhagens celulares, normais e tumorais, incluindo a linhagem L929 e demonstraram que o mio-inositol apresentou um efeito promotor da proliferação celular, comprovando pela primeira vez que o mio-inositol constitui um fator de crescimento essencial para as linhagens celulares cultivadas. Além do mio-inositol, estes autores também evidenciaram que o IP6 (1 uM) e o IP1 (monofosfato de inositol) apresentaram efeitos promotores de crescimento celular.

Mais recentemente, Lima *et al.* (2015) avaliaram a citotoxicidade do IP6 para duas linhagens de células (tumoral e não tumoral). O objetivo do trabalho destes autores foi avaliar o efeito anticâncer do IP6 para células T leucêmicas (Jurkat), sendo assim fez-se necessária a avaliação da seletividade do IP6 para as células normais, tendo em vista que um dos critérios mais relevantes para produção de um medicamento terapêutico consiste na promoção de mínimos efeitos colaterais para células normais. Dessa forma, além da avaliação da citotoxicidade do IP6 sobre a viabilidade de células Jurkat, eles também determinaram a citotoxicidade do IP6 nas concentrações de (2, 4 e 6 mM) por 48h em células normais de linfócitos humanos, usando o ensaio do MTT e pelo ensaio de exclusão do corante azul de tripano. Os resultados obtidos demonstraram que em nenhuma das concentrações testadas do IP6 em linfócitos periféricos apresentou efeitos citotóxicos e todas resultaram em um percentual de viabilidade celular superior a 100%, ratificando mais uma vez que o IP6 estimula a

proliferação celular. Porém, os resultados destes estudos demonstraram que o efeito da concentração do IP6 sobre a proliferação celular varia entre diferentes tipos celulares.

No presente estudo, selecionamos como agente indutor de estresse oxidativo o peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Além de ser o agente mais comumente prescrito para induzir o estresse oxidativo em culturas de células e tecidos animais, devido principalmente a sua capacidade de atravessar rapidamente na membrana celular, tem o potencial de gerar radicais hidroxila pela interação com metais de transição, resultante de reações do tipo Fenton (LI *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2017). Os radicais hidroxila constituem uma espécie reativa de oxigênio extremamente agressiva e nociva, sendo responsáveis pelo dano oxidativo da maioria das biomoléculas, incluindo o DNA (PISOSCHI; POP, 2015; ŽIVKOVIĆ *et al.*, 2017).

Sabendo-se que o H_2O_2 apresenta capacidade de induzir danos ao material genético, nosso objetivo inicial foi determinar uma concentração capaz de apresentar uma mínima citotoxicidade para as células L929, uma vez que altas concentrações do H_2O_2 podem apresentar níveis de citotoxicidade elevados e, conseqüentemente, ocasionar a morte celular. Os resultados da citotoxicidade do H_2O_2 para células L929 apontaram que concentrações abaixo de 100 μM apresentaram uma menor redução da viabilidade celular (Figura 9). Embora a avaliação do efeito citotóxico de diferentes concentrações de H_2O_2 para células L929 mostraram quais concentrações causaram uma mínima citotoxicidade, fez necessário identificar uma concentração do H_2O_2 que fosse capaz de induzir danos ao DNA em um nível adequado para as avaliações de genotoxicidade propostas. Sendo assim, foi realizado um pré-teste utilizando a versão alcalina do ensaio cometa (dados não mostrados), sendo as células L929 expostas as três concentrações de H_2O_2 que demonstraram uma baixa citotoxicidade (100, 75 e 50 μM). De acordo com os resultados obtidos neste pré-teste, foi possível observar que as células tratadas com o H_2O_2 75 μM exibiram um nível de danos ao DNA suscetíveis de serem analisados, demonstrando assim uma genotoxicidade mediada por estresse oxidativo em células L929. Por esta razão, a concentração de 75 μM do H_2O_2 foi escolhida para induzir o estresse oxidativo nos experimentos posteriores.

Trabalhos anteriores já demonstraram a capacidade do AF de conferir proteção contra o estresse oxidativo em células submetidas a outros agentes oxidativos que não o H_2O_2 . Estudos de Xu *et al.* (2008) apontaram o efeito protetor do IP6 contra a neurotoxicidade induzida por 1-metil-4-fenilpiridínio (MPP^+) em células neuronais dopaminérgicas mesencefálicas (N27). O composto MPP^+ caracteriza-se por ser um indutor de estresse oxidativo por meio da liberação de ferro ligado à ferritina e seu conseqüente acúmulo, principalmente no cérebro, levando as células neuronais à morte por apoptose. Como resultado, os autores observaram que o pré-tratamento com IP6 a 30 e 100 μM por 24 horas, aumentou a sobrevivência das células N27, respectivamente, em 18% e 42% quando expostas ao MPP^+ em condições com excesso de ferro. Essa ação protetora do IP6 foi atribuída a sua propriedade antioxidante e capacidade quelante do ferro acumulado pela ação do MPP^+ .

Lee *et al.* (2012) avaliaram a atividade antioxidante de alguns fitoquímicos, incluindo o ácido fítico em células de carcinoma hepático humano (SK-Hep-1). Em seus estudos eles comprovaram os efeitos citoprotetores dos fitoquímicos testados contra o estresse oxidativo desencadeado pelo metabolismo oxidativo e não oxidativo do etanol. Os resultados deste estudo demonstraram efeitos positivos do AF na proteção das células SK-Hep-1, sendo observada uma redução da hepatotoxicidade induzida pelo etanol via inibição de produção de EROs e a restauração do sistema antioxidante.

No presente estudo foi avaliado o potencial anticitotóxico do AF para as células L929, com a finalidade de observar se o pré-tratamento das células com AF apresentava capacidade de proteger as células contra o estresse oxidativo induzido pelo H_2O_2 . Os resultados da avaliação anticitotóxica mostraram que o pré-tratamento das células com AF nas concentrações de 0,156 e 0,0156 mM por 24 horas, seguida da exposição ao agente oxidante (H_2O_2 75 μM), resultou em um efeito citoprotetor para as células L929, aumentando significativamente o percentual de viabilidade celular, quando comparado ao tratamento das células somente com

H₂O₂ 75 µM (Figura 10). Esses resultados demonstraram ainda que, além de proteger as células contra o efeito citotóxico do H₂O₂, o pré-tratamento das células L929 com as duas menores concentrações de AF (0,156 e 0,0156 mM) estimulou a proliferação celular, tendo em vista o percentual de viabilidade celular superior ao controle negativo. Vale ressaltar que os níveis de viabilidade aqui observados foram 122,49% e 114,50% em células pré-tratadas com 0,156 e 0,0156 mM de AF, respectivamente. Estes valores são muito semelhantes aos obtidos nos experimentos de citotoxicidade (128,83% e 135,40%) discutidos anteriormente, o que nos permite inferir que nessas concentrações o AF parece ser capaz de anular o estresse oxidativo provocado pelo peróxido de hidrogênio, via inibição da produção de radical hidroxila pela reação de Fenton, restabelecendo o equilíbrio oxidativo nas células.

Entretanto, ao contrário do observado para as duas menores concentrações, pode-se verificar que o pré-tratamento das células com 1,56 mM de AF não mostrou efeito citoprotetor contra o estresse oxidativo induzido pelo H₂O₂, pelo contrário, a viabilidade celular detectada neste tratamento (57,67%) foi inferior à obtida nas células expostas ao H₂O₂ sem o pré-tratamento com AF (69,64%). Apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa, para explicar o fato da concentração do AF 1,56 mM não apresentar uma ação citoprotetora, pode-se considerar o fato anteriormente discutido de que 1,56 mM seria uma concentração elevada de AF para os fibroblastos L929, de modo que a fração não interligada poderia estar capturando os íons presentes no meio de cultivo, tornando-os indisponíveis para as células. Assim, o efeito antioxidativo desempenhado pela fração de AF internalizada estaria sendo “anulada” pelo efeito antiproliferativo de uma alta concentração de AF.

Após todas as análises de citotoxicidade, foi dada continuidade aos experimentos, sendo o próximo passo investigar se o tratamento das células com AF induzia genotoxicidade para células L929. Para isso foi utilizado o ensaio cometa, o qual consiste em um método versátil, econômico, rápido, confiável e capaz de detectar danos no DNA em células individualizadas, sendo a versão alcalina a mais comumente usada pelo fato de identificar um amplo espectro de danos ao DNA, incluindo quebras de fita de simples e dupla, sítio álcali-lábeis, ligação cruzada entre DNA- DNA, crosslink DNA-proteína (CORDELLI; BIGNAMI; PACCHIEROTTI, 2021; GLEI; SCHNEIDER; SCHLÖRMANN, 2016; TICE *et al.*, 2000).

Na avaliação do potencial genotóxico, os resultados obtidos para todas as concentrações testadas de AF em células L929 não demonstraram diferença estatisticamente significativa no percentual de células com diferentes níveis de dano, assim como no score, quando comparado ao controle negativo. Isso é um indicativo de que nestas concentrações o ácido fítico não apresenta nenhum efeito genotóxico para as células L929. Ausência de genotoxicidade do AF também foi observada em células do epitélio testicular e espermatozoides de ratos tratados com IP6 via oral (2% diluídos em água) (ALKHALAF *et al.*, 2020). Anteriormente, Whittaker *et al.* (2001) já haviam demonstrado a ausência do efeito genotóxico do AF em concentrações variando de 1,5 a 7,5 mM por meio do ensaio mutagênico em linfoma de ratos (L5178Y).

Vale ressaltar que no presente estudo os valores dos scores obtidos no tratamento das células nas três concentrações de AF apresentaram-se menores do que no controle negativo, demonstrando que o AF nestas concentrações apresenta uma ação protetora contra o estado oxidativo basal das células. Este efeito pode estar contribuindo também para o aumento na proliferação celular observado nos testes de viabilidade, pelo menos no que diz respeito às duas menores concentrações. Assim, pode-se inferir que a redução dos níveis basais do estresse oxidativo imposto sobre o DNA reduziria também os níveis basais de danos genotóxicos, o que levaria a um provável aumento da taxa de proliferação resultante, por exemplo, de um menor tempo do ciclo celular requerido para o processo de reparo.

Os resultados da avaliação de antigenotoxicidade mostraram que o pré-tratamento das células L929 com AF promoveu uma redução estatisticamente significativa nos scores de dano (níveis 1-3), quando comparamos todas as concentrações testadas de AF com o tratamento das células somente com H₂O₂ 75 µM (controle positivo). Além disso, o cálculo do percentual de redução de dano ao DNA (% R) mostrou que o pré-tratamento com AF foi capaz de promover

a redução de lesões oxidativas ao DNA induzidas pelo H_2O_2 em níveis superiores a 70% em todas as concentrações avaliadas. Com isso, foi demonstrando que, além de não apresentar efeito genotóxico e de reduzir os níveis de danos genotóxicos basais, o tratamento com AF resultou na atenuação de danos ao DNA induzidos pelo H_2O_2 .

Em um estudo recente, Alkhalaf *et al.* (2020) avaliaram o potencial protetor do IP6 contra a genotoxicidade induzida pela ciclofosfamida (CP) em células testiculares de ratos, usando o ensaio cometa. Neste estudo, a CP foi usada para induzir danos ao DNA, por ser considerada um agente alquilante, que afeta no processo de replicação do DNA durante a divisão celular, além de induzir estresse oxidativo. Eles identificaram que para todos os parâmetros avaliados (comprimento da cauda, % de DNA na cauda e momento da cauda), o tratamento concomitante das células com IP6 e CP apresentaram uma redução de dano ao DNA significativa quando comparado ao tratamento das células somente com CP (controle positivo do teste). Estes resultados, juntamente com os de outros parâmetros avaliados, levaram os autores a sugerirem que o efeito protetor do IP6 contra a toxicidade induzida pela CP estaria correlacionado a sua atividade antioxidante.

Outros estudos utilizando outras metodologias de detecção de danos ao DNA demonstraram o potencial antigenotóxico do ácido fítico. Kawanishi *et al.* (2005) avaliaram a segurança de alguns antioxidantes, incluindo o AF, luteonina e ácido retinoico, em relação a sua reatividade com o DNA, utilizando um sistema livre de células. De acordo com os seus resultados, o AF foi o único entre os antioxidantes avaliados capaz de inibir eficientemente a formação do indicador de dano oxidativo ao DNA, a 8-oxo-7,8-diidro-2-desoxiguanina (8-oxoG), em células tratadas com sistema gerador de H_2O_2 , usando a glicose oxidase. Anteriormente, utilizando um método fluorescente que detecta lesões no DNA induzidas pelo tratamento álcali, denominado *Fluorimetric Detection of Alkaline DNA Unwinding* (FADU), Kamp *et al.* (1995) demonstraram que o tratamento com AF (0,5 mM) foi capaz de reduzir a formação de quebras no DNA de células epiteliais de pulmão induzidas por amianto. Neste trabalho os autores também observaram que o AF foi capaz de reduzir a formação do radical hidroxila que é produzido pela reação do ferro presente no amianto com o H_2O_2 , atribuindo o efeito protetor do AF a sua propriedade quelante.

O potencial antigenotóxico de outros quelantes de ferro também já foi avaliado utilizando o ensaio cometa. Fedato e Maistro (2012) demonstraram o efeito protetor *in vivo* do composto sintético derivado da cumarina 4-metilesculetina (4-ME), contra os danos ao DNA induzidos por doxorubicina (DXR). A cumarina é caracterizada por ser um composto vegetal e apresenta entre as suas propriedades, a atividade antioxidante, sendo esta atividade observada também em seus compostos derivados. A atividade antioxidante está associada à sua potente ação de sequestrante de espécies reativas de oxigênio e pela sua ação quelante de metais de transição, por exemplo, íons férricos (Fe^{3+}), que inibem a reação de Fenton e reduzem a formação de radicais hidroxila. A doxorubicina (DXR) por sua vez, é um agente utilizado no tratamento contra células tumorais, sendo que a sua ação está associada à formação de ânions superóxido que podem gerar outras EROs, como os radicais hidroxila e peróxido de hidrogênio. Os níveis de redução nos danos detectados por Fedato e Maistro variaram de 24,1 a 93,2% nos diferentes tipos de células avaliadas, tendo essa redução sido atribuída à atividade antioxidante do 4-ME, que reduz a formação de radicais livres, protegendo o DNA contra o dano oxidativo induzido pela DXR.

Nesta pesquisa foi utilizado um método da biologia molecular baseado na detecção de modificações na conformação topológica do DNA plasmidial, cuja finalidade foi comprovar o potencial genoprotetor do AF pela avaliação da sua capacidade de inibir a ocorrência de quebras de fita simples e dupla no DNA do plasmídeo pET 28a, induzido por H_2O_2 na presença de íons de ferro (reação de Fenton) em um sistema livre de células. Além disso, foi avaliado se o AF causa alterações topológicas na estrutura superenrolada do DNA, ou seja, se apresenta ação genotóxica.

De acordo com os resultados obtidos na avaliação do potencial genotóxico, pode-se observar que as concentrações testadas do AF não induziram clivagem ao DNA do pET 28a, não afetando a forma superenrolada compacta do DNA. Pela análise da quantificação das bandas foi evidenciado que o percentual de DNA íntegro (na forma superenrolada) obtido nos três tratamentos com AF foi semelhante ao grupo controle de DNA, o que nos permitiu constatar que o AF não afeta a estrutura compacta do DNA do pET 28a. Estes dados foram compatíveis com os resultados obtidos no ensaio cometa, no qual foi observado que nestas mesmas concentrações do AF, não foi observada genotoxicidade para as células L929.

Na avaliação do efeito protetor exercido pelo AF contra quebras no DNA plasmidial induzidas via reação de Fenton ($\text{FeSO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$), foi possível evidenciar que nas três concentrações avaliadas do AF houve a formação de duas bandas, uma de movimento rápido que é caracterizado como DNA nativo (superenrolado) e outra de movimento mais lento que corresponde ao DNA circular relaxado, resultado de quebra de fita simples. A quantificação das bandas permitiu identificar um percentual de DNA intacto (banda de movimento rápido) ligeiramente maior nas amostras tratadas com o AF antes da exposição à reação de Fenton quando comparado ao DNA exposto somente aos elementos da reação de Fenton. Apesar dessa diferença não ter sido estatisticamente significativa, pode-se inferir que nas condições experimentais utilizadas, o pré-tratamento com AF protegeu apenas parcialmente o DNA plasmidial da clivagem induzida pelos subprodutos da reação de Fenton.

Estudos realizados por Muraoka e Miura (2004) demonstraram o efeito protetor do AF contra o estresse oxidativo mediado pela enzima xantina oxidase (XO), utilizando o ensaio de topologia do plasmídeo pBR322. A XO é uma enzima que catalisa o processo de oxidação da xantina, formando como subprodutos desta reação ácido úrico e ânion superóxido (O_2^-) o qual é convertido em peróxido de hidrogênio pela SOD (VAVÁKOVÁ *et al.*, 2015). Muraoka e Miura (2004) observaram através da análise das bandas conformacionais formadas na corrida eletroforética que nas concentrações de 10 e 100 mM o AF bloqueou o dano induzido ao DNA pela XO, na presença de adenosina difosfato (ADP) e íons férricos (Fe^{3+}). Sendo assim, os autores atribuíram o efeito protetor do AF à sua atividade antioxidante, através da capacidade quelante de ferro (GRAF e EATON, 1990).

Portanto, formula-se como hipótese para explicar o baixo efeito protetor do AF contra o dano induzido pelos produtos da reação de Fenton ao DNA plasmidial o fato das concentrações de AF avaliadas no presente estudo terem sido muito baixas para o sistema livre de células. Dessa forma, pode-se sugerir que o AF nas concentrações de 0,0156 mM, 0,156 mM e 1,56 mM não foi suficiente para quelar níveis relevantes de íons de ferro presentes no sistema a ponto de inibir de modo substancial a formação de radicais hidroxila. Deste modo, novos experimentos serão conduzidos utilizando concentrações mais elevadas de AF.

Com os resultados obtidos neste estudo, foi possível comprovar que o AF exibe propriedades anticitotóxicas e antigenotóxicas, tendo em vista sua ação protetora contra o estresse oxidativo induzido pelo peróxido de hidrogênio ao DNA. Essa ação protetora pode ser baseada principalmente na presença de grupamentos fosfato em sua estrutura, com destaque para aqueles das posições 1, 2 e 3 (axial-equatorial-axial), os quais apresentam uma interação específica com íons de ferro, formando assim complexos quelatos ($\text{AF} - \text{Fe}^{3+}$) (SILVA e BRACARENSE, 2016; VUCENIK e SHAMSUDDIN, 2006). Apesar do H_2O_2 não induzir danos diretos ao DNA, ele é capaz de oxidar o Fe^{2+} , abundante no núcleo (MENEHINI (1997), a Fe^{3+} , sendo assim reduzido ao íon hidroxila e a radical hidroxila pela reação de Fenton. Uma vez que o AF tem a propriedade de sequestrar íons Fe^{2+} sua ação impossibilita a ocorrência da reação de Fenton, evitando o acúmulo de radical hidroxila, consequentemente reduzindo ou mesmo inibindo os danos causados pelo estresse oxidativo ao DNA.

7. CONCLUSÃO

O presente estudo demonstrou que o ácido fítico apresenta potentes atividades anticitotóxicas e antigenotóxicas, protegendo o DNA das células de fibroblastos murino (L929) contra a citotoxicidade e genotoxicidade induzida pelo estresse oxidativo. De acordo com nossos achados, podemos formular como hipótese que a ação antigenotóxica do AF exibida nos resultados do ensaio cometa, está diretamente associada à sua atividade antioxidante, que através de sua propriedade quelante reduz íons de Fe^{3+} em íons Fe^{2+} .

Portanto, os resultados aqui apresentados contribuíram para identificação das propriedades protetoras do AF ao DNA das células L929 e enfatizam a importância de futuras pesquisas para investigação de outros mecanismos adicionais que estão associados à sua função genoprotetora.

8. PERSPECTIVAS

Tendo em vista que se faz necessário o emprego de uma metodologia complementar concomitante ao ensaio cometa, a fim de comprovar o potencial antigenotóxico nas concentrações do AF avaliadas neste estudo, como pesquisas futuras para este trabalho estão a realização do ensaio do micronúcleo com bloqueio de citocinese (CBMN). Com essa análise poderemos avaliar o efeito mutagênico e antimutagênico do AF com vista aos danos clastogênicos e aneugênicos induzidos pelo estresse oxidativo. Assim, além do efeito do AF sobre a incidência de lesões que podem ser reparadas (avaliadas pelo ensaio cometa), serão produzidas informações acerca de seu efeito sobre a formação de lesões irreparáveis, que são detectadas pelo ensaio do micronúcleo (CBMN).

Será também realizada futuramente a avaliação do efeito do ácido fólico no reparo das células L929 contra o dano induzido por estresse oxidativo, utilizando o ensaio cometa.

Além disso, a avaliação de concentrações maiores de AF é necessária a fim de melhor avaliar o efeito antigenotóxico do AF no sistema livre de células pela análise das conformações topológicas do DNA plasmidial.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-HAMID, N. M.; FADDAH, L. M.; AL-REHANY, M. A.; ALI A. H.; BAKEET, A. A. New role of antinutritional factors, phytic acid and catechin in the treatment of CCl₄ intoxication. **Annals of Hepatology**, v. 6, n. 4, p. 262–266, 2007.

ABDULWALIYU, I.; AREKEMASE, S. O.; ADUDU, J. A.; BATARI, M. L.; Mercy EGBULE, N.; OKODUWA, S. I. R. Investigation of the medicinal significance of phytic acid as an indispensable anti-nutrient in diseases. **Clinical Nutrition Experimental**, v. 28, p. 42–61, 2019.

AFANASIEVA, K.; SIVOLOB, A. Physical principles and new applications of comet assay. **Biophysical Chemistry**, v. 238, n. March, p. 1–7, 2018.

ALI, S. S.; AHSAN, H.; ZIA, M. K.; SIDDIQUI, T.; KHAN, F. H. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players. **Journal of Food Biochemistry**, v. 44, n. 3, p. 1–13, 2020.

ALKHALAF, M. I.; ALANSARI, W. S.; ALSHUBAILY, F. A.; ALNAJEEBI, A. M.; ESKANDRANI, A.A.; TASHKANDI, M. A.; BABTEEN, N. A. Chemoprotective effects of inositol hexaphosphate against cyclophosphamide-induced testicular damage in rats. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–13, 2020.

ALTIERI, F.; GRILLO, C.; MACERONI, M.; CHICHIARELLI, S. DNA damage and repair: From molecular mechanisms to health implications. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 10, n. 5, p. 891–937, 2008.

AMIR ASLANI, B.; GHOBADI, S. Studies on oxidants and antioxidants with a brief glance at their relevance to the immune system. **Life Sciences**, v. 146, p. 163–173, 2016.

ANANIEVA, E. A.; GILLASPY, G. E. Switches in nutrient and inositol signaling. **Plant Signaling and Behavior**, v. 4, n. 4, p. 304–306, 2009.

ANDRADE, S.; RAMALHO, M. J.; LOUREIRO, J. A.; PEREIRA, M. do C. Natural Compounds for Alzheimer's Disease Therapy: A Systematic Review of Preclinical and Clinical Studies. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 2313, p. 1-41, 2019.

ARIZA-NIETO, M.; BLAIR, M. W.; WELCH, R. M.; GLAHN, R. P. Screening of iron bioavailability patterns in eight bean (*Phaseolus vulgaris* L.) genotypes using the Caco-2 cell in vitro model. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n. 19, p. 7950–7956, 2007.

ARULSELVAN, P.; FARD, M. T.; TAN, W. S.; GOTHAI, S.; FAKURAZI, S.; NORHAIZAN, M. E.; KUMAR, S. S. Role of Antioxidants and Natural Products in Inflammation. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

AZQUETA, A.; LADEIRA, C.; GIOVANNELLI, L.; BOUTET-ROBINET, E.; BONASSI, S.; NERIG, M.; GAJSKI, G.; DUTHIE, S.; DEL BO, C.; RISO, P.; KOPPEN, G.; BASARAN, N.; COLLINS, A.; MØLLER, P. Application of the comet assay in human biomonitoring: An hCOMET perspective. **Mutation Research - Reviews in Mutation Research**, v. 783, p. 108288, 2020.

AZQUETA, A.; COLLINS, A. R. The essential comet assay: A comprehensive guide to

measuring DNA damage and repair. **Archives of Toxicology**, v. 87, n. 6, p. 949–968, 2013.

BEN SGHAIER, M.; BHOURI, W.; NEFFATI, A.; BOUBAKER, J.; SKANDRANI, I.; BOUHLEL, I.; KILANI, S.; CHEKIR-GHEDIRA, L.; GHEDIRA, K. Chemical investigation of different crude extracts from *Teucrium ramosissimum* leaves. Correlation with their antigenotoxic and antioxidant properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 49, n. 1, p. 191–201, 2011.

BHATTACHARYYA, A.; CHATTOPADHYAY, R.; MITRA, S.; CROWE, S. E. Oxidative stress: An essential factor in the pathogenesis of gastrointestinal mucosal diseases. **Physiological Reviews**, v. 94, n. 2, p. 329–354, 2014.

BHOWMIK, A.; OJHA, D.; GOSWAMI, D.; DASA, R.; CHANDRA, N. S.; CHATTERJEE, T. K.; CHAKRAVARTY, A.; CHAKRAVARTY, S.; CHATTOPADHYAY, D. Inositol hexa phosphoric acid (phytic acid), a nutraceuticals, attenuates iron-induced oxidative stress and alleviates liver injury in iron overloaded mice. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 87, p. 443–450, 2017.

BIRBEN, E.; SAHINER, U. M.; SACKESEN, C.; ERZURUM, S.; KALAYCI, O. Oxidative stress and antioxidant defense. **World Allergy Organization Journal**, v. 5, n. 1, p. 9–19, 2012.

BOHN, L.; MEYER, A. S.; RASMUSSEN, S. K. Phytate: Impact on environment and human nutrition. A challenge for molecular breeding. **Journal of Zhejiang University: Science B**, v. 9, n. 3, p. 165–191, 2008.

BOLOGNESI, C.; CIRILLO, S.; CHIPMAN, J. K. Comet assay in ecogenotoxicology: Applications in *Mytilus* sp. **Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v. 842, n. May, p. 50–59, 2019.

BRIEGER, K.; SCHIAVONE, S.; JR MILLER, F. J.; KRAUSE, K. H. Reactive oxygen species: From health to disease. **Swiss Medical Weekly**, v. 142, 2012.

BURANAAMNUAY, K. The MTT assay application to measure the viability of spermatozoa: A variety of the assay protocols. **Open Veterinary Journal**, v. 11, n. 2, p. 251–269, 2021.

CAROCHO, M.; FERREIRA, I. C. F. R. A review on antioxidants, prooxidants and related controversy: Natural and synthetic compounds, screening and analysis methodologies and future perspectives. **Food and Chemical Toxicology**, v. 51, n. 1, p. 15–25, 2013.

ÇERÇİ, E.; ERDOST, H. Stem cell. **Ataturk Universitesi Veteriner Bilimleri Dergisi**, v. 14, n. 2, p. 221–228, 2019.

CHATGILIALOGLU, C.; FERRERI, C.; KROKIDIS, M. G.; MASI, A.; TERZIDIS, M. A. On the relevance of hydroxyl radical to purine DNA damage. **Free Radical Research**, v. 55, n. 4, p. 384–404, 2021.

CHATREE, S.; THONGMAEN, N.; TANTIVEJKUL, K.; SITTICHAROON, C.; VUCENIK, I. Role of inositols and inositol phosphates in energy metabolism. **Molecules**, v. 25, n. 21, p. 1–18, 2020.

CHEESEMAN, K. H.; SLATER, T. F. Introduction to free radicals. **Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology**, v. 22, n. 100, p. 1–18, 1993.

CICCIA, A.; ELLEDGE, S. J. The DNA Damage Response: Making It Safe to Play with Knives. **Molecular Cell**, v. 40, n. 2, p. 179–204, 2010.

COLLINS, A. R. The comet assay for DNA damage and repair: Principles, applications, and limitations. **Applied Biochemistry and Biotechnology - Part B Molecular Biotechnology**, v. 26, n. 3, p. 249–261, 2004.

COMINELLI, E.; CONFALONIERI, M.; CARLESSI, M.; CORTINOVIS, G.; DAMINATI, M. G.; PORCH, T. G.; LOSA, A.; SPARVOLI, F. Phytic acid transport in *Phaseolus vulgaris*: A new low phytic acid mutant in the PvMRP1 gene and study of the PvMRPs promoters in two different plant systems. **Plant Science**, v. 270, n. February, p. 1–12, 2018.

CORDELLI, E.; BIGNAMI, M.; PACCHIEROTTI, F. Comet assay: A versatile but complex tool in genotoxicity testing. **Toxicology Research**, v. 10, n. 1, p. 68–78, 2021.

COULIBALY A.; KOUAKOU, B.; CHEN, J. Phytic acid in cereal grains: structure, healthy or harmful ways to reduce phytic acid in cereal grains and their effects on nutritional quality. **American Journal of Plant Nutritional and Fertilization Technology**, v. 1, n. 1, p. 1–22, 2011. Disponível em: <http://www.phyticacid.org/nuts/phytic-acid-in-nuts/>. Acesso em: 10 de outubro de 2020.

DEMIRCI-ÇEKİÇ, S.; ÖZKAN, G.; AVAN, A. N.; UZUNBOY, S.; ÇAPANOĞLU, E.; APAK, R. Biomarkers of Oxidative Stress and Antioxidant Defense. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v. 209, p. 114477, 2022.

DI MEO, S.; REED, T. T.; VENDITTI, P.; VICTOR, V. M. Role of ROS and RNS Sources in Physiological and Pathological Conditions. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016.

DOU, Y.; GOLD, H. D.; LUQUETTE, L. J.; PARK, P. J. Detecting Somatic Mutations in Normal Cells. **Trends in Genetics**, v. 34, n. 7, p. 545–557, 2018.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, n. 1, p. 47–95, 2002.

DUAN, J.; DUAN, J.; ZHANG, Z.; TONG, T. Irreversible cellular senescence induced by prolonged exposure to H₂O₂ involves DNA-damage-and-repair genes and telomere shortening. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 37, n. 7, p. 1407–1420, 2005.

EAGLE, H.; OYAMA, V.I.; LEVY, M.; FREEMAN, A. E. myo-INOSITOL AS AN ESSENTIAL GROWTH AND MALIGNANT HUMAN cells in TISSUE CULTURE. **Journal of Biological Chemistry**, v. 226, n. Table I, p. 191–205, 1956.

FAIRBAIRN, D. W.; OLIVE, P. L.; O'NEILL, K. L. The comet assay: a comprehensive review. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v. 339, n. 1, p. 37–59, 1995.

FEDATO, R. P.; MAISTRO, E. L. Absence of genotoxic effects of the coumarin derivative 4-methylsculetin in vivo and its potential chemoprevention against doxorubicin-induced DNA damage. **Journal of Applied Toxicology**, v. 34, n. 1, p. 33–39, 2012.

FEIZOLLAHI, E.; MIRMAHDI, R. S.; ZOGHI, A.; ZIJLSTRA, R. T.; ROOPESH, M. S.; VASANTHAN, T. Review of the beneficial and anti-nutritional qualities of phytic acid, and procedures for removing it from food products. **Food Research International**, v. 143, n. February, 2021.

FREDLUND, K.; ISAKSSON, M.; ROSSANDER-HULTHE, L.; ALMGRENA, A.; SANDBERG, A. S. Absorption of zinc and retention of calcium: Dose-dependent inhibition by phytate. **Journal of Trace Elements in Medicine and Biology**, v. 20, n. 1, p. 49–57, 2006.

GINTER, E.; SIMKO, V.; PANAKOVA, V. Antioxidants in health and disease. **Bratislava Medical Journal**, v. 54, n. 10, p. 176–186, 2001.

GLEI, M.; SCHNEIDER, T.; SCHLÖRMANN, W. Comet assay: an essential tool in toxicological research. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 10, p. 2315–2336, 2016.

GONÇALVES, L. C. Avaliação do potencial genotóxico e antigenotóxico de *Lycium barbarum* (Goji Berry), nutracêutico usado como citoprotetor e antioxidante. 2018. 153 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Rio Claro-SP, 2018.

GONÇALVES, S.; GAIVÃO, I. Natural ingredients common in the Trás-os-montes region (Portugal) for use in the cosmetic industry: A review about chemical composition and antigenotoxic properties. **Molecules**, v. 26, n. 17, 2021.

GRAF, E.; EATON, J. W. Dietary suppression of colonic cancer fiber or phytate? **Cancer**, v. 56, n. 4, p. 717–718, 1985.

GRAF, E.; EATON, J. W. Antioxidant functions of phytic acid. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 8, n. 1, p. 61–69, 1990.

GRAUPNER, A.; EIDE, D. M.; BREDE, D. A.; ELLENDER, M.; HANSEN, E. L.; OUGHTON, D. H.; BOUFFLER, S. D.; BRUNBORG, G.; OLSEN, A. K. Genotoxic effects of high dose rate X-ray and low dose rate gamma radiation in ApcMin/+ mice. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 58, n. 8, p. 560–569, 2017.

GULCIN, İ. Antioxidants and antioxidant methods: an updated overview. **Archives of Toxicology**, v. 94, p. 651–715, 2020.

GUPTA, R. K.; GANGOLIYA, S. S.; SINGH, N. K. Reduction of phytic acid and enhancement of bioavailable micronutrients in food grains. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 676–684, 2015.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Free radicals in biology and medicine.. **Oxford University Press, New York**, 4th Edition, 2007.

HE, L.; HE, T.; FARRAR, S.; JI, LI.; LIU, T.; MA, X. Antioxidants Maintain Cellular Redox Homeostasis by Elimination of Reactive Oxygen Species. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 44, n. 2, p. 532–553, 2017.

HOEIJMAKERS, J. H. J. The consequences of DNA injury Genome maintenance mechanisms for preventing cancer. **Nature**, v. 411, n. 6835, p. 366–374, 2001.

- HOEIJMAKERS, J. H. J. DNA Damage, Aging, and Cancer. p. 1475–1485, 2009.
- IZQUIERDO-VEGA, J. A.; MORALES-GONZÁLEZ, J. A.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M.; BETANZOS-CABRERA, G.; SOSA-DELGADO, S. M.; SUMAYA-MARTÍNEZ, M. T.; MORALES-GONZÁLEZ, Á.; PANIAGUA-PÉREZ, R.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 1: Fruits and polysaccharides. **Nutrients**, v. 9, n. 2, p. 1–27, 2017.
- JHA, A. N. Ecotoxicological applications and significance of the comet assay. **Mutagenesis**, v. 23, n. 3, p. 207–221, 2008.
- JONES, D. P. Redefining Oxidative Stress. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 8, n. 9-10, p. 1865-1879, 2006.
- KAJARABILLE, N.; LATUNDE-DADA, G. O. Programmed cell-death by ferroptosis: Antioxidants as mitigators. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 19, 2019.
- KAMP, D. W.; ISRABIAN, V. A.; PREUSEN, S. E.; ZHANG, C. X.; WEITZMAN, S. A. Asbestos causes DNA strand breaks in cultured pulmonary epithelial cells: role of iron-catalyzed free radicals. **Pneumologie**, v. 50, n. 11, p. 798, 1995.
- KARKLE, E. N. L.; BELEIA, A. Effect of soaking and cooking on phytate concentration, minerals, and texture of food-type soybeans. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, n. 4, p. 1056–1060, 2010.
- KAWANISHI, S.; OIKAWA, S.; MURATA, M. Evaluation for safety of antioxidant chemopreventive agents. **Antioxidants and Redox Signaling**, v. 7, n. 11–12, p. 1728–1739, 2005.
- KEJÍK, Z.; KAPLÁNEK, R.; MASARÍK, M.; BABULA, P.; MATKOWSKI, A.; FILIPENSKÝ, P.; VESELÁ K.; GBUREK, J.A.; SÝKORA, D.; MARTÁSEK, P.; JAKUBEK, M. Iron complexes of flavonoids-antioxidant capacity and beyond. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 22, n. 2, p. 1–20, 2021.
- KIZILIAN, N.; WILKINS, R.C.; REINHARDT, P.; FERRAROTTO, C.; MCLEAN, J. R. N.; MCNAMEE, J. P. Silver-stained comet assay for detection of apoptosis. **BioTechniques**, v. 27, n. 5, p. 926–930, 1999.
- KLAUNIG, J. E.; KAMENDULIS, L. M.; HOCEVAR, B. A. Oxidative stress and oxidative damage in carcinogenesis. **Toxicologic Pathology**, v. 38, n. 1, p. 96–109, 2010.
- KOBAYASHI, H.; SUGIGYAMA, C.; MORIKAWA, Y.; HAYASHI, M.; SOFUNI, T. A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gell eletrophoresis assay. **MMS Commun.**, v. 3, p. 103-115, 1995.
- KUCHAŘOVÁ, M.; HRONEK, M.; RYBÁKOVÁ, K.; ZADÁK, Z.; ŠTĚTINA, R.; JOSKOVÁ, V.; PATKOVÁ, A. Comet assay and its use for evaluating oxidative DNA damage in some pathological states. **Physiological Research**, 2019.
- KUMAR, A.; SINGH, B.; RAIGOND, P.; SAHU, C.; MISHRA, U. N.; SHARMA, S.; LAL, M. K. Phytic acid: Blessing in disguise, a prime compound required for both plant and human

nutrition. **Food Research International**, v. 142, n. February, p. 110193, 2021.

KUMAR, M. K. P.; SHYAMA, S. K.; SONAYE, B. S.; NAIKA, U. R.; KADAM, S. B.; BIPIN, P. D.; D'COSTA, A.; CHAUBEY, R. C. Evaluation of γ -radiation-induced DNA damage in two species of bivalves and their relative sensitivity using comet assay. **Aquatic Toxicology**, v. 150, p. 1–8, 2014.

KUMAR, V.; SINHA, A. K.; MAKKAR, H. P. S.; BECKER, K. Dietary roles of phytate and phytase in human nutrition: A review. **Food Chemistry**, v. 120, n. 4, p. 945–959, 2010.

KUO, H. F.; CHANG, T. Y.; CHIANG, S. F.; WANG, W. D.; CHARNG, Y.; CHIOU, T. J. Arabidopsis inositol pentakisphosphate 2-kinase, AtIPK1, is required for growth and modulates phosphate homeostasis at the transcriptional level. **Plant Journal**, v. 80, n. 3, p. 503–515, 2014.

LAHA, D.; JOHNEN, P.; AZEVEDO, C.; DYNOWSKI, M.; WEIß, M.; CAPOLICCHIO, S.; MAO, H.; IVEN, T.; STEENBERGEN, M.; FREYER, M.; GAUGLER, P.; DE CAMPOS, M. K. F.; ZHENG, N.; FEUSSNER, I.; JESSEN, H. J.; VAN WEES, S. C. M.; SAIARDI, A.; SCHAAF, G. VIH2 regulates the synthesis of inositol pyrophosphate InsP8 and jasmonate-dependent defenses in arabidopsis. **Plant Cell**, v. 27, n. 4, p. 1082–1097, 2015.

LATRASSE, D.; JÉGU, T.; MENG, P. H.; MAZUBERT, C.; HUDIK, E.; DELARUE, M.; CHARON, C.; CRESPI, M.; HIRT, H.; RAYNAUD, C.; BERGOUNIOUX, C.; BENHAMED, M. Dual function of MIPS1 as a metabolic enzyme and transcriptional regulator. **Nucleic Acids Research**, v. 41, n. 5, p. 2907–2917, 2013.

LEE, H. S.; LEE, D. H.; CHO, H. K.; KIM, S. H.; AUH, J. H.; PAI, H. S. InsP6-sensitive variants of the Gle1 mRNA export factor rescue growth and fertility defects of the ipk1 low-phytic-acid mutation in arabidopsis. **Plant Cell**, v. 27, n. 2, p. 417–431, 2015.

LEE, K. M.; KANG, H. S.; YUN, C. H.; KWAK, H. S. Potential in vitro protective effect of quercetin, catechin, caffeic acid and phytic acid against ethanol-induced oxidative stress in SK-Hep-1 cells. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 5, p. 492–498, 2012.

LEWINSKA, A.; WNUK, M.; SLOTA, E.; BARTOSZ, G. Total anti-oxidant capacity of cell culture media. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, v. 34, n. 8, p. 781–786, 2007.

LI, Y.; ZHAO, W.; WANG, L.; CHEN, Y.; ZHANG, H.; WANG, T.; YANG, X.; XING, F.; YAN, J.; FANG, X. Protective Effects of Fucoidan against Hydrogen Intestinal Epithelial Cells. **Animals**, v. 9, p. 1–14, 2019.

LI, L.; YANG, R.; YIN, C.; KEE, K. Studying human reproductive biology through single-cell analysis and in vitro differentiation of stem cells into germ cell-like cells. **Human Reproduction Update**, v. 26, n. 5, p. 670–688, 2020.

LIMA, E. M. de.; KANUNFRE, C. C.; DE ANDRADE, L. F.; GRANATO, D.; ROSSO, N. D. Cytotoxic effect of inositol hexaphosphate and its Ni(II) complex on human acute leukemia Jurkat T cells. **Toxicology in Vitro**, v. 29, n. 8, p. 2081–2088, 2015.

LING, X. C.; KUO, K. L. Oxidative stress in chronic kidney disease. **Renal Replacement Therapy**, v. 4, n. 1, 2018.

LOBO, V.; PATIL, A.; PHATAK, A.; CHANDRA, N. Free radicals, antioxidants and functional foods: Impact on human health. **Pharmacognosy Reviews**, v. 4, n. 8, p. 118–126, 2010.

LÓPEZ-ROMERO, D.; IZQUIERDO-VEJA, J. A.; MORALES-GONZÁLEZ, J. A.; MADRIGAL-BUJAJIDAR, E.; CHAMORRO-CEVALLOS, G.; SÁNCHEZ-GUTIÉRREZ, M.; BETANZOS-CABRERA, G.; ALVAREZ-GONZALEZ, I.; MORALES-GONZÁLEZ, Á.; MADRIGAL-SANTILLÁN, E. Evidence of some natural products with antigenotoxic effects. Part 2: Plants, vegetables, and natural resin. **Nutrients**, v. 10, n. 1954, p. 1-46, 2018.

LU, AL.; LI, X.; GU, Y.; WRIGHT, P. M.; CHANG, DY. Repair of oxidative DNA damage: mechanisms and functions. **Cell Biochemistry and Biophysics**, v. 35, n. 2, p. 141–170, 2001.

LUNA-LÓPEZ, A.; TRIANA-MARTÍNEZ, F.; LÓPEZ-DIAZGUERRERO, N. E.; VENTURA-GALLEGOS, J. L.; GUTIÉRREZ-RUIZ, M. C.; DAMIÁN-MATSUMURA, P.; ZENTELLA, A.; GÓMEZ-QUIROZ, L. E.; KÖNIGSBERG, M. Bcl-2 sustains hormetic response by inducing Nrf-2 nuclear translocation in L929 mouse fibroblasts. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 49, n. 7, p. 1192–1204, 2010.

MACHADO, C. D. S.; AISSA, A. F.; RIBEIRO, D. L.; ANTUNES, L. M. G. Vitamin D supplementation alters the expression of genes associated with hypertension and did not induce DNA damage in rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health - Part A: Current Issues**, v. 82, n. 4, p. 299–313, 2019.

MAROLT, G.; KOLAR, M. Analytical methods for determination of phytic acid and other inositol phosphates: A review. **Molecules**, v. 26, n. 1, 2021.

MAURICI, D.; AARDEMA, M.; CORVI, R.; KLEBER, M.; KRUL, C.; LAURENT, C.; LOPRIENO, N.; PASANEN, M.; PFUHLER, S.; PHILLIPS, B.; SABBIONI, E.; SANNER, T.; VANPARYS, P. Contributions of DNA repair and damage response pathways to the non-linear genotoxic responses of alkylating agents. **Mutat Res Rev Mutat Res.**, v. 767, n. SUPPL. 1, p. 77–91, 2016.

MENDOZA-MILLA, C.; RODRÍGUEZ, C. M.; ALARCÓN, E. C.; BERNAL, A. E.; TOLEDO-CUEVAS, E. M.; MARTÍNEZ, E. M.; DEHESA, A. Z. NF- κ B activation but not PI3K/Akt is required for dexamethasone dependent protection against TNF- α cytotoxicity in L929 cells. **FEBS Letters**, v. 579, n. 18, p. 3947–3952, 2005.

MENEGHINI, R. Iron homeostasis, oxidative stress, and dna damage. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 23, n. 5, p. 783–792, 1997.

MITSCHER, L.; TELIKEPALLI, H.; MCGHEE, E.; SHANKEL, D. M. Natural antimutagenic agents. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 350, n. 1, p. 143–152, 1996.

MONTEIRO, R. T.; SILVA, C. A. da.; BRIDI, A. M.; OBRA, A.; LOZANO, A. P.; PERES, L. M.; NOVAIS, A. K.; OLIVEIRA, E. R. de. Efeito do ácido fítico e do ferro inorgânico dietéticos na qualidade da carne suína refrigerada. **Boletim de Indústria Animal**, v. 72, n. 3, p. 261–270, 2015.

MOSMANN, T. Benzimidazole based Pt(II) complexes with better normal cell viability than cisplatin: Synthesis, substitution behavior, cytotoxicity, DNA binding and DFT study. **RSC**

Advances, v. 65, p. 55–63, 1983.

MUNNIK, T.; VERMEER, J. E. M. Osmotic stress-induced phosphoinositide and inositol phosphate signalling in plants. **Plant, Cell and Environment**, v. 33, n. 4, p. 655–669, 2010.

MURAOKA, S.; MIURA, T. Inhibition of xanthine oxidase by phytic acid and its antioxidative action. **Life Sciences**, v. 74, n. 13, p. 1691–1700, 2004.

NAGARATHNA, P. K. M.; WESLEY, M. J.; REDDY, P. S.; REENA, K. Review on genotoxicity, its molecular mechanisms and prevention. **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, v. 22, n. 1, p. 236–243, 2013.

NGA, N. T. H.; NGOC, T. T. B.; TRINH, N. T. M.; THUOC, T. L.; THAO, D. T. P. Optimization and application of MTT assay in determining density of suspension cells. **Analytical Biochemistry**, v. 610, n. August, p. 113937, 2020.

NIMSE, S. B.; PAL, D. Free radicals, natural antioxidants, and their reaction mechanisms. **RSC Advances**, v. 5, n. 35, p. 27986–28006, 2015.

O'DELL, B. L.; DE BOLAND, A. R.; KOIRTYOHANN, S. R. Distribution of Phytate and Nutritionally Important Elements among the Morphological Components of Cereal Grains. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 20, n. 3, p. 718–723, 1972.

OMORUYI, F. O.; BUDIAMAN, A.; ENG, Y.; OLUMESE, F. E.; HOESEL, J. L.; EJILEMELE, A.; OKORODUDU, A. O. The potential benefits and adverse effects of phytic acid supplement in streptozotocin-induced diabetic rats. **Advances in Pharmacological Sciences**, v. 2013, 2013.

OMORUYI, F. O.; STENNETT, D.; FOSTER, S.; DILWORTH, L. New frontiers for the use of ip6 and inositol combination in treating diabetes mellitus: A review. **Molecules**, v. 25, n. 7, p. 1–15, 2020.

OSTLING, D.; JOHANSON, K. J. Microelectrophoretic study of radiation-induced DNA damages in individual mammalian cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 123, n. 1, p. 291–298, 1984.

PATERAS, I. S.; HAVAKI, S.; NIKITOPOULOU, X.; VOUGAS, K.; TOWNSEND, P. A.; PANAYIOTIDIS, M. I.; GEORGAKILAS, A. G.; GORGOULIS, V. G. The DNA damage response and immune signaling alliance: Is it good or bad? Nature decides when and where. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 154, p. 36–56, 2015.

PETROSKI, W.; MINICH, D. M. Is There Such a Thing as Anti-Nutritents? **Nutrients**, v. 12, p. 1–32, 2020.

PHILLIPS, D. H.; ARLT, V. M. Genotoxicity: damage to DNA and its consequences. **Clinical and Environmental Toxicology**, v. 1, p. 87–110, 2009.

PISOSCHI, A. M.; POP, A. The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 97, p. 55–74, 2015.

PLAAMI, S. Myoinositol phosphates: Analysis, content in foods and effects in nutrition. **LWT - Food Science and Technology**, v. 30, n. 7, p. 633–647, 1997.

POLJSAK, B.; ŠUPUT, D.; MILISAV, I. Achieving the balance between ROS and antioxidants: When to use the synthetic antioxidants. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, 2013.

QI, L.; WU, X. C.; ZHENG, D. Q. Hydrogen peroxide, a potent inducer of global genomic instability. **Current Genetics**, v. 65, n. 4, p. 913–917, 2019.

QUIRRENBACH, H. R.; KANUMFRE, F.; ROSSO, N. D.; CARVALHO FILHO, M. A. Comportamento do ácido fítico na presença de Fe(II) e Fe(III). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 24–32, 2009.

RABOY, V. myo-Inositol-1,2,3,4,5,6-hexakisphosphate. **Phytochemistry**, v. 64, n. 6, p. 1033–1043, 2003.

RAHMAN, I.; KODE, A.; BISWAS, S. K. Assay for quantitative determination of glutathione and glutathione disulfide levels using enzymatic recycling method. **Nature Protocols**, v. 1, n. 6, p. 3159–3165, 2007.

RAHMAN, K. Studies on free radicals, antioxidants, and co-factors. **Clinical interventions in aging**, v. 2, n. 2, p. 219–236, 2007.

RAJENDRAN, P.; NANDAKUMAR, N.; RENGARAJAN, T.; PALANISWAMI, R.; GNANADHAS, E. N.; LAKSHMINARASIAH, U.; GOPAS, J.; NISHIGAKI, I. Antioxidants and human diseases. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 332–347, 2014.

ROGERO, S. O.; LUGÃO, A. B.; IKEDA, T. I.; CRUZ, Á. S. Teste in vitro de citotoxicidade: estudo comparativo entre duas metodologias. **Materials Research**, v. 6, n. 3, p. 317–320, 2003.

RYBKOVÁ, Z.; MALACHOVÁ, K.; CERVEN, J.; SEZIMOVÁ, H.; PECINKA, P. Antimutagenic and DNA damage protective activities of a grape extract from *Vitis vinifera*. **Journal of Biosciences and Medicines**, v. 4, p. 1–8, 2016.

SABAHI, Z.; SOLTANI, F.; MOEIN, M. Insight into DNA protection ability of medicinal herbs and potential mechanisms in hydrogen peroxide damages model. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 8, n. 2, p. 120–129, 2018.

SAROKIN, L.; CARLSON, M. Nucleic Acids Research Nucleic Acids Research. **Methods**, v. 12, n. 21, p. 8235–8251, 1984.

SCHRADER, M.; FAHIMI, H. D. Peroxisomes and oxidative stress. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1763, n. 12, p. 1755–1766, 2006.

SGHAIER, M. B.; ISMAIL, M. B.; BOUHLEL, I.; GHEDIRA, K.; CHEKIR-GHEDIRA, L. Leaf extracts from *Teucrium ramosissimum* protect against DNA damage in human lymphoblast cell K562 and enhance antioxidant, antigenotoxic and antiproliferative activity. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 44, p. 44–52, 2016.

SHAMSUDDIN, A.K.; BOSE, S. IP6 (Inositol Hexaphosphate) as a Signaling Molecule. **Current Signal Transduction Therapy**, v. 7, n. 3, p. 289–304, 2012.

SHARMA, P.; JHA, A. B.; DUBEY, R. S.; PESSARAKLI, M. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. **Journal of Botany**, v. 2012, p. 1–26, 2012.

SHEARS, S. B. Assessing the omnipotence of inositol hexakisphosphate. **Cellular Signalling**, v. 13, n. 3, p. 151–158, 2001.

SIES, H. Oxidative stress: introductory remarks. **In Oxidative Stress**, H. Sies, Ed. London: Academic Press Inc, 1985. p. 1-7.

SILVA, C. T. DA; JASIULIONIS, M. G. Relação entre estresse oxidativo, alterações epigenéticas e câncer. **Ciência e Cultura**, v. 66, n. 1, p. 38–42, 2014.

SILVA, E. O.; BRACARENSE, A. P. F. R. L. Phytic Acid: From Antinutritional to Multiple Protection Factor of Organic Systems. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 6, p. R1357–R1362, 2016.

SINGH, A.; KUKRETI, R.; SASO, L.; KUKRETI, S. Oxidative stress: A key modulator in neurodegenerative diseases. **Molecules**, v. 24, n. 8, p. 1–20, 2019.

SINGH, N. P.; MCCOY, M. T.; TICE, R. R.; SCHNEIDER, E. L. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Experimental Cell Research**, v. 175, n. 1, p. 184–191, 1988.

SINGH, R. P.; AGARWAL, R. Prostate cancer and inositol hexaphosphate: Efficacy and mechanisms. **Anticancer Research**, v. 25, n. 4, p. 2891–2904, 2005.

SŁOCZYŃSKA, K.; POWROŹNIK, B.; PEKALA, E.; WASZKIELEWICZ, A. M. Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action. **Journal of Applied Genetics**, v. 55, p. 273-285, 2014.

SLUPPHAUG, G.; KAVLI, B.; KROKAN, H. E. The interacting pathways for prevention and repair of oxidative DNA damage. **Mutation Research - Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 531, n. 1–2, p. 231–251, 2003.

SOARES, S. E. Phenolic acids as antioxidants. **Revista de Nutrição**, v. 15, n. 1, p. 71–81, 2002.

SOULIOTIS, V. L.; VLACHOGIANNIS, N. I.; PAPPA, M.; ARGYRIOU, A.; NTOUROS, P. A.; SFIKAKIS, P. P. DNA damage response and oxidative stress in systemic autoimmunity. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 1, p. 1–24, 2020.

SPARVOLI, F.; COMINELLI, E. Phytate Transport by MRPs. **Plant ABC Transporters**, p. 19–38, 2014.

SPARVOLI, F.; COMINELLI, E. Seed biofortification and phytic acid reduction: A conflict of interest for the plant? **Plants**, v. 4, n. 4, p. 728–755, 2015.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The comet assay: a sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, v. 314, p. 275–286, 2006.

ŠRÁM, R. J.; BINKOVÁ, B. Molecular epidemiology studies on occupational and environmental exposure to mutagens and carcinogens, 1997-1999. **Environmental Health Perspectives**, v. 108, n. SUPPL. 1, p. 57–70, 2000.

TAFANI, M.; SANSONE, L.; LIMANA, F.; ARCANGELI, T.; SANTIS, E. de.; POLESE, M.; FINI, M.; RUSSO, M. A. The Interplay of Reactive Oxygen Species, Hypoxia, Inflammation, and Sirtuins in Cancer Initiation and Progression. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2016, 2016. TICE, R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; MIYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J. C.; SASAKI Y. F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology. **Arch Environ Contam Toxicol**, v. 35, p. 206–221, 2000.

TWENTYMAN, P.R.; LUSCOMBE, M. A study of some variables in a tetrazolium dye (MTT) based assay for cell growth and chemosensitivity. **British Journal of Cancer**, v. 56, n. 3, p. 279–85, 1987.

VERGER, E.; CHENG, J.; SANTIS, V. de.; IAFRATE, M.; JACKSON, J. A.; IMBERTI, C.; FRUHWIRTH, G. O.; BLOWER, P. J.; MA, M. T.; BURNHAM, D. R.; TERRY, S. Y. A. Validation of the plasmid study to relate DNA damaging effects of radionuclides to those from external beam radiotherapy. **Nuclear Medicine and Biology**, v. 100–101, p. 36–43, 2021.

VUCENIK, I. Anticancer properties of inositol hexaphosphate and inositol: An overview. **Journal of Nutritional Science and Vitaminology**, v. 65, p. S18–S22, 2019.

VUCENIK, I.; DRUZIJANIC, A.; DRUZIJANIC, N. Inositol Hexaphosphate (IP6) and Colon Cancer: From Concepts and First Experiments to Clinical Application. **Molecules (Basel, Switzerland)**, v. 25, n. 24, p. 1–13, 2020.

VUCENIK, I.; SHAMSUDDIN, A. M. Protection against cancer by dietary IP6 and inositol. **Nutrition and Cancer**, v. 55, n. 2, p. 109–125, 2006.

WANG, Z. J.; XIE1, J. H.; NIE, S. P.; XIE, M. Y. Review on cell models to evaluate the potential antioxidant activity of polysaccharides. **Food and Function**, v. 8, n. 3, p. 915–926, 2017.

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.

WEINBERG, S. E.; SUN, L. Y.; YANG, A. L.; LIAO, J.; YANG, G. Y. Overview of inositol and inositol phosphates on chemoprevention of colitis-induced carcinogenesis. **Molecules**, v. 26, n. 1, p. 1–11, 2021.

WHITTAKER, P.; SEIFRIED, H. E.; SAN, R. H. C.; CLARKE, J. J.; DUNKEL, V. C. Genotoxicity of iron chelators in L5178Y mouse lymphoma cells. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v. 38, n. 4, p. 347–356, 2001.

WINDHORST, S.; LIN, H.; BLECHNER, C.; FANICK, W.; BRANDT, L.; BREHM, M. A.; MAYR, G. W. Tumour cells can employ extracellular Ins(1,2,3,4,5,6)P6 and multiple inositol-polyphosphate phosphatase 1 (MINPP1) dephosphorylation to improve their proliferation. **Biochemical Journal**, v. 450, n. 1, p. 115–125, 2013.

WOJTCZYK-MIASKOWSKA, A.; SCHLICHTHOLZ, B. DNA damage and oxidative stress in long-lived aquatic organisms. **DNA Repair**, v. 69, p. 14–23, 2018.

WOLPE SIMAS, L. A.; GRANZOTI, R. O.; PORSCH, L. Estresse oxidativo e o seu impacto no envelhecimento: uma revisão bibliográfica. **Brazilian Journal of Natural Sciences**, v. 2, n. 2, p. 80–85, 2019.

XU, D. P.; LI, Y.; MENG, X.; ZHOU, T.; ZHOU, Y.; ZHENG, J.; ZHANG, J. J.; LI, H. B. Natural antioxidants in foods and medicinal plants: Extraction, assessment and resources. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 1, p. 20–31, 2017.

XU, Q.; KANTHASAMY, A. G.; REDDY, M. B. Neuroprotective effect of the natural iron chelator, phytic acid in a cell culture model of Parkinson's disease. **Toxicology**, v. 245, n. 1–2, p. 101–108, 2008.

YEUNG, S. Y.; LANB, W. H.; HUANGA, C. S.; LIN, C. P.; CHAN, C. P.; CHANG, M. C.; JENG, J. H. Scavenging property of three cresol isomers against H₂O₂, hypochlorite, superoxide and hydroxyl radicals. **Food and Chemical Toxicology**, v. 40, n. 10, p. 1403–1413, 2002.

ZHANG, K.; ZHENG, D. Q.; SUI, Y.; QI, L.; PETES, T. D. Genome-wide analysis of genomic alterations induced by oxidative DNA damage in yeast. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 7, p. 3521–3535, 2019.

ŽIVKOVIĆ, L.; BOROZAN, S.; ABARKAPA, A. H.; TOPALOVIT, D.; CIPTASARI, U.; BAJIT, V.; SPREMO-POTPAREVIT, B. Antigenotoxic properties of *Agaricus blazei* against hydrogen peroxide in human peripheral blood cells. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, 2017.

ZUCCO, F.; ANGELIS, I. de.; TESTAI, E.; STAMMATI, A. Toxicology investigations with cell culture systems: 20 Years after. **Toxicology in Vitro**, v. 18, n. 2, p. 153–163, 2004.