

## Scientific Electronic Archives

Issue ID: Sci. Elec. Arch. Vol. 10 (3)

June 2017

Article link

<http://www.seasinop.com.br/revista/index.php?journal=SEA&page=article&op=view&path%5B%5D=325&path%5B%5D=pdf>

Included in DOAJ, AGRIS, Latindex, Journal TOCs, CORE, Discursio Open Science, Science Gate, GFAR, CIARDRING, Academic Journals Database and NTHRYS Technologies, Portal de Periódicos CAPES.



## Avaliação da atividade antimutagênica/mutagênica da romã (*punica granatum* L.) através do teste do micronúcleo *in vivo*

### Activity assessment antimutagenic / mutagenic pomegranate (*punica granatum* L.) through the *in vivo* test micronucleus

J. B. Ferreira, B. H. B. Martins, W. M. Tominaga, E. M. J. Lisboa, L. R. Albiero, A. C. Rosa, M. M. Sugui

Universidade Federal de Mato Grosso - Campus Sinop

Author for correspondence: [masugui@hotmail.com](mailto:masugui@hotmail.com)

**Resumo.** Atualmente, a *Punica granatum* Linn, conhecida por romã, tem sido introduzida na dieta da população, devido suas propriedades terapêuticas, usada como uma terapia alternativa capaz de atuar contra várias doenças, inclusive o câncer. A fruta é rica em compostos fenólicos, que lhe conferem inúmeros efeitos biológicos, dentre eles, a atividade antioxidante. O presente estudo teve por objetivo avaliar a atividade antimutagênica/mutagênica do extrato aquoso da fruta em medula óssea de camundongos machos Swiss, em danos ao DNA induzidas pelo agente alquilante Ciclofosfamida (CPA) através do Teste do Micronúcleo *in vivo*. Os animais (5 animais/grupo) foram tratados pelo período de 15 dias consecutivos com extrato aquoso da romã, via gavagem, no 15º dia receberam NaCl (0,9%) ou CPA (25 mg/Kg) intraperitonealmente, sendo sacrificados após um intervalo de 24 horas, e confeccionado material de sua medula óssea para análise da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados (MNPCE). Os resultados obtidos através do estudo apontam uma redução no número de MNPCE nos animais pré-tratados com extrato aquoso da romã, sob as condições de estudo descritas. Não houve indicações de atividade mutagênica da fruta sobre o DNA, o que sugere a realização de futuros estudos sobre o mecanismo de ação de compostos específicos, para que se possam assegurar os benefícios de seu uso à população.

**Palavras chaves:** *Punica granatum*. Antimutagenicidade. Ciclofosfamida. Teste do micronúcleo.

**Abstract.** Currently, *Punica granatum* Linn, known as pomegranate, has been introduced in the diet of the population because its therapeutic properties used as an alternative therapy capable of acting against various diseases, including cancer. The fruit is rich in phenolic compounds which give many biological effects including antioxidant activity. The present study aimed to evaluate the antimutagenic/mutagenic activity of aqueous fruit extract in bone marrow from male Swiss mice in DNA damage induced by the alkylating agent cyclophosphamide (CP) through the micronucleus test *in vivo*. Animals (five animals/group) were treated for a period of 15 consecutive days with aqueous extract of pomegranate (gavage) on day 15 received NaCl (0,9%) or CP (25 mg/kg) intraperitoneally and sacrificed after an interval of 24 hours and made the material his bone marrow for analysis of the frequency of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE). The results obtained from the study show a reduction in the number of MNPCE in animals pretreated with aqueous extract of pomegranate, under the study conditions described. There were no indications of mutagenic activity of the fruit on the DNA suggesting that future studies on the mechanism of action of specific compounds so that we can ensure the benefits of its use to the population.

**Keywords:** *Punica granatum*. Antimutagenicity. Cyclophosphamide. Micronucleus Test.

### Introdução

Considerado anteriormente como uma doença prevalente em países ricos, o câncer tem mudado esta característica atualmente, pois se torna cada vez mais frequente na população de países em desenvolvimento, com poucos recursos em relação à saúde. Dessa forma, o câncer se tornou um problema de saúde pública mundial.

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012) estima-se que em 2030 haja 27 milhões de casos incidentes de câncer, 17 milhões de mortes por câncer e 75 milhões de pessoas vivas, anualmente, com câncer, atingindo principalmente os países de baixa e média renda. No Brasil, a estimativa para 2014, sugere cerca de 580.000 novos casos de câncer, os mais incidentes

na população brasileira no ano de 2014 serão pele não melanoma (182 mil), próstata (69 mil); mama (57 mil); cólon e reto (33 mil), pulmão (27 mil) e estômago (20 mil), sendo ao todo 19 tipos de câncer mais incidentes, com estimativa de 14 na população masculina e 17 na feminina (INCA, 2014).

Embora seja grande a busca e estudos realizados para a criação de medicamentos eficazes no tratamento desta enfermidade, os avanços não têm sido muitos, pois esta é uma doença que traz grandes prejuízos às células por sua agressividade, como também pela toxicidade medicamentosa da terapia (RAFFERTY et al., 1996; NEWMANN, 2003). Assim, os estudos sobre mutagenicidade tornou-se alvo crescente de investimentos científicos em âmbito nacional e mundial, tendo observado a relação entre mutação e câncer (VARELLA et al., 2004; CARDOSO, 2006).

Estudos científicos têm associado muitos casos de câncer a fatores relacionados ao estilo de vida, incluindo fatores nutricionais (SHUKLA e GUPTA, 2005). Sendo a dieta um dos principais fatores influenciadores para vários tipos de câncer, onde são notadas também evidências positivas de que muitas substâncias presentes nos alimentos e na natureza podem oferecer proteção contra alguns tipos de câncer (LIU, 2004; HOENSCH e KIRCH, 2005). Portanto, a quimioprevenção do câncer é um fator de extrema importância para melhorar a qualidade de vida humana, já que a proteção da exposição a fatores de risco nem sempre é possível (WILLET, 2002).

A romã (*Punica granatum*, L.) é uma fruta originária da região do Oriente Médio. A árvore cresce em regiões áridas e a produção do fruto se dá no período de setembro a fevereiro (MARTINS, 1995). Dentre os fitoconstituintes presentes na planta, destacam-se flavonóides (apigenina e narigenina), antocianinas, taninos (ácidos gálico e elágico), alcalóides, ácido ascórbico, ácidos graxos conjugados (ácido púnico) e o ácido ursólico (LANSKY e NEWMANN, 2007).

Atualmente, a romã tem sido muito estudada devido o aumento do seu uso pela população em relação ao potencial antiinflamatório, antimicrobiano, antioxidante, etc. (NAVARRO et al., 1996). A fruta apresenta, em sua composição, compostos que possuem influência sobre fatores biológicos e conseqüentemente, apresentam efeitos quimiopreventivos contra algumas doenças (SYED et al., 2007).

Alguns estudos demonstram que o suco do fruto da *P. granatum* além de retardar a oxidação e a síntese de prostaglandinas, pode inibir a proliferação de células tumorais, reduzir a invasão tumoral, promover a apoptose e ainda inibir a formação de vasos da membrana corioalantóide (TOI et al., 2003). Portanto, o estudo propõe avaliar do potencial antimutagênico/mutagênico e verificar o possível mecanismo de ação do extrato aquoso da romã *in vivo*, objetivando verificar o potencial terapêutico.

## Métodos

O presente estudo trata-se de uma pesquisa exploratória experimental. O estudo exploratório procura fornecer maior delineamento do estudo a respeito do problema proposto, com intuito de torná-los mais explícito. A pesquisa experimental é um dos meios mais utilizados no meio científico. É baseada na determinação de um objeto de estudo, com a seleção de variáveis que possam influenciá-lo e estabelecer meios de controle para tais variáveis, onde o pesquisador é um agente ativo no processo (GIL, 2002).

### Sistema teste

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa animal (CEPA)-UFMT pelo número de protocolo 23108.780794/12-0. Foram utilizados camundongos *Swiss* machos, com seis semanas de idade, com peso médio de 25g, obtidos do Biotério Central da UFMT *Campus* Cuiabá. Durante o período experimental, os animais permaneceram no Biotério do LiPeQ/UFMT/Sinop, sob condições controladas de temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ), umidade relativa ( $55 \pm 10\%$ ), ciclo de luz (12 horas claro/escuro), exaustão, recebendo ração comercial peletizada e água filtrada *ad libitum*. O período de aclimação foi de duas semanas antes do tratamento.

### Agente químico

A ciclofosfamida (CPA) foi diluída em solução salina 0,9% e administrada aos animais intraperitonealmente, na concentração de 25 mg/kg p.c (DELMANTO, 2001).

### Romã

As romãs foram lavadas e abertas à temperatura ambiente. Para a extração da polpa, retirou-se a parte interna e colocou-se sobre uma peneira plástica de 17 cm de diâmetro, posicionada sobre um béquer de 500 mL envolto em papel alumínio e protegido da luz. A fruta foi friccionada contra a peneira e coletado na forma de suco (JARDINI e FILHO, 2007). O armazenamento do suco foi realizado a  $-20^\circ\text{C}$  e, para o uso, foram descongelados em banho-maria a  $37^\circ\text{C}$ . Foi administrada uma dose de 0,2 mL animal/dia do extrato aquoso da romã.

### Teste do micronúcleo *in vivo*

A obtenção e preparo das lâminas de eritrócitos de medula óssea para avaliação da frequência de micronúcleo (MN) seguiu a metodologia proposta por MacGregor et al. (1987). Foram analisadas 1000 células por animal em microscópio de luz, com aumento de 1000 vezes (imersão). O material foi analisado em teste cego e as lâminas foram decodificadas ao final das análises.

### Delineamento experimental

Os animais foram divididos em 4 grupos com 5 animais cada, conforme descritos a seguir e apresentados na Figura 4:

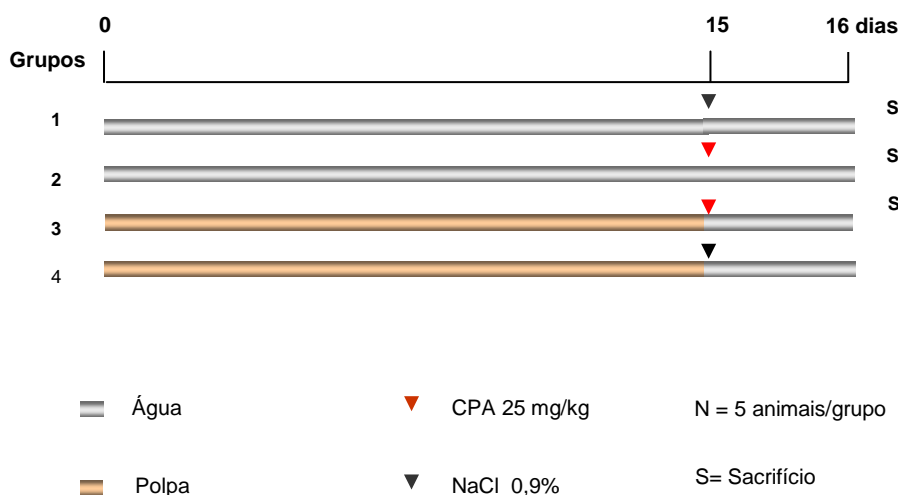
**Grupo 1:** Grupo controle negativo. Os animais foram tratados com água, via gavagem, durante todo período experimental. No 15<sup>o</sup> dia os animais foram tratados, por via intraperitoneal, com NaCl 0,9% (0,1ml/10g p.c.) e sacrificados 24 horas após o tratamento para obtenção de células de medula óssea.

**Grupo 2:** Grupo controle positivo. Os animais foram tratados com água, via gavagem, durante todo período experimental. No 15<sup>o</sup> dia os animais foram tratados, por via intraperitoneal, com CPA (25 mg/kg p.c.) e sacrificados 24 horas após o

tratamento para obtenção de células de medula óssea.

**Grupo 3:** Grupo tratado com o suco da polpa da romã, via gavagem, durante todo o período experimental. No 15<sup>o</sup> dia os animais receberam tratamento intraperitoneal com CPA (25 mg/kg p.c.) e sacrificados 24 horas após o tratamento para obtenção de células da medula óssea.

**Grupo 4:** Grupo tratado somente com o suco da polpa da romã, via gavagem, durante todo o período experimental. No 15<sup>o</sup> dia os animais receberam tratamento intraperitoneal com NaCl 0,9% (0,1ml/10g p.c.) e sacrificados 24 horas após o tratamento para obtenção de células da medula óssea.



**Figura 4** - Protocolo experimental para avaliação do efeito antimutagênico e mutagênico da romã na frequência de micronúcleo, em células de medula óssea de camundongo Swiss.

#### Análise estatística

A frequência de células micronucleadas nos diferentes grupos experimentais foi comparada pelo teste do qui-quadrado (PEREIRA, 1991).

#### Resultados e discussão

Atualmente, a fruta romã (*Punica granatum*, L.) tem despertado especial atenção devido suas propriedades medicinais (VIDAL et al., 2003; SÁNCHEZ-LAMAR et al., 2008) e quanto ao potencial quimioprotetor para o câncer por possuir em sua composição química compostos com atividade antimutagênica (ALEKPEROV, 2002; VALADARES et al., 2010), anticâncer e anti-inflamatória (KIM et al., 2002; ADAMS et al., 2006; LANSKY e NEWMAN, 2007; SYED et al., 2007).

Neste contexto, a Tabela 1 apresenta o efeito da *Punica granatum*, L. (romã) sobre danos no DNA, induzidos quimicamente pela ciclofosfamida (CPA), em camundongos pré-tratados com o extrato aquoso *in natura* da fruta. Os resultados mostram que o grupo tratado com o extrato aquoso da polpa da romã e a ciclofosfamida (polpa + CPA) reduziu significativamente a frequência de micronúcleos em eritrócitos

policromáticos (PCE) de medula óssea, quando comparado com o grupo controle positivo. Observa-se também que o grupo tratado somente com o extrato aquoso da romã não apresentou potencial mutagênico quando comparado com o grupo controle negativo.

Valadares et al. (2010), verificaram atividade antimutagênica do extrato etanólico das folhas e dos frutos da *Punica granatum* contra danos induzidos ao DNA pela ciclofosfamida em camundongos, sendo que atividade clastogênica não foi observada. Da mesma forma, Pereira, Paula e Valadares (2005), concluíram que o extrato alcoólico das folhas da *Punica granatum* promoveu uma redução significativa, de forma dose-dependente, na incidência de células micronucleadas em animais pré e pós tratados, no modelo de indução de micronúcleos pela ciclofosfamida e, nas diferentes concentrações empregadas, não possui atividade clastogênica.

Dassprakash et al., (2012), observaram atividade antigenotóxica do extrato das folhas da *Punica granatum* contra danos induzidos ao DNA pela ciclofosfamida em medula óssea de

camundongos Swiss, além do potencial antioxidante *in vitro*.

**Tabela 1** - Frequência de micronúcleo em eritrócito policromático (MNPCEs) de medula óssea de camundongo, após pré-tratamento com extrato aquoso da romã e Ciclofosfamida (CPA).

Tratamentos	Número de células analisadas	MNPCEs		% de redução
		Nº	%	
Água+ NaCl 0,9% <sup>a</sup>	5000	41	0,41	
Água + CPA (25mg/Kg) <sup>b</sup>	5000	213	2,13	
Romã + CPA (25mg/Kg)	5000	127	1,27*	50
Romã + NaCl 0,9%	4000c	25	0,25	

<sup>a</sup> Controle negativo; <sup>b</sup> Controle positivo; <sup>c</sup> 1 animal morreu  
\*p<0,05

Zahin, Aqil e Ahmad (2010), verificaram atividade antimutagênica do extrato metanólico da casca da *Punica granatum in vitro* através do Teste de Ames em cepas de *Salmonella typhimurium*.

A importante atividade quimiopreventiva da *Punica granatum* L. contra o crescimento tumoral tem grande relevância na área de mutagênese (KIM, et al. 2002; HORA, et al., 2003). Estudos realizados nesta área, comprovaram que os eventos mutagênicos estão relacionados com os processos carcinogênicos, o que nos leva a tentar identificar compostos naturais, com efeito protetor, que possam minimizar os danos causados por esses agentes.

Oliveira et al., (2010), verificaram que os extratos de *Punica granatum*, tanto da folha quanto do fruto, apresentam relevante atividade antitumoral *in vitro* e *in vivo*, utilizando células de Tumor Ascítico de Ehrlich e camundongos Swiss, respectivamente.

Vários estudos, em relação ao potencial antitumoral da *Punica granatum*, têm identificado atividade antitumoral resultante da atividade apoptótica seletiva contra diferentes linhagens de células cancerígenas, tanto na fração lipídica quanto aquosa de seu extrato (KIM, et al., 2002; ALBRECHT et al., 2004; JOHAR et al., 2004; SEERAM et al., 2005).

Kim et al. (2002), realizaram pesquisas *in vitro* que indicam efeitos antiproliferativos em células tumorais de pulmão humano quando tratados com extrato bruto de sementes e da casca da romã. Pesquisas apontam que *Punica granatum* possui compostos que atuam no processo de angiogênese que é de grande importância no desenvolvimento e metástase tumoral (KIM, et al., 2002; LANSKY, et al., 2005).

Kawaii e Lansky (2004) realizaram estudos sobre a ação de extratos de *Punica granatum* na promoção da diferenciação de células humanas leucêmicas HL-60 promielocíticas, onde os polifenóis da fruta, ricos em flavonóides, apresentaram ação anti-invasiva, antiproliferativa e pró-apoptótica em células de mama e próstata, além de potencial antiangiogênico *in vivo* e *in vitro*.

Efeito quimioprotetor também foi demonstrado em um estudo *in vivo* que tratou tumores de pele em ratos com o óleo da romã, onde

houve uma diminuição significativa no número de tumores, podendo ser considerado um potente agente preventivo do câncer de pele (HORA et al., 2003).

Atualmente, produtos derivados de romã (suco, extrato e óleo) foram investigados com objetivo de prevenir fotoenvelhecimento e câncer de pele causado pela radiação UV-B, sendo que Afaq et al. (2008) comprovaram que os três produtos podem ser úteis contra os danos induzidos por este tipo de radiação. Park (2010), utilizando fibroblastos da pele humana, observou que a catequina, polifenol encontrado na *Punica granatum*, desempenha efeitos fotoprotetores ao examinar a eficácia do extrato da romã na proteção da pele contra danos dos raios UV-B.

De acordo com Ferreira (2009), a atividade quimioprotetora ao DNA pode estar associada aos compostos fenólicos, presente nos flavonas, que agem como potenciais agentes antimutagênicos, devido sua ação antioxidante. Afaq et al. (2004) relataram que, para a prevenção do câncer, agentes com capacidade de intervir em mais de um ponto crítico no processo da carcinogênese, têm vantagem sobre agentes de único-alvo.

Katsube et al. (2003), estudando componentes fitoquímicos das frutas vermelhas, com ênfase nos pigmentos fenólicos observaram em maior abundância as antocianinas. A antocianina possui atividade antioxidante, participando como mediadora das funções fisiológicas relacionadas à supressão do câncer, uma vez que, age como inibidora de crescimento celular. Os flavonóides, também encontrados em abundância nestas frutas vermelhas, com capacidade de induzir células cancerígenas a apoptose. Desta forma, a associação de flavonóides e antocianinas é importante na prevenção do câncer.

Jardini e Filho (2007) relataram a eficácia do potencial antioxidante dos compostos aquosos da polpa e semente da romã, identificados através da cromatografia em camada delgada como compostos fenólicos. Salgado et al. (2012), mostraram alta concentração de compostos fenólicos com atividade antioxidante na casca da *Punica granatum* quando comparado com a semente e polpa. Nunzio et al. (2013), verificaram que ações diferentes de

compostos fenólicos e atividade antioxidante podem estar relacionados com o cultivo da planta.

Ressaltamos que a avaliação do potencial antioxidante do extrato aquoso da *Punica granatum* foi realizada nos grupos tratados, na qual está em fase de leitura pelos responsáveis do estudo. Resultados parciais apresentam um possível efeito antioxidante da romã, uma vez que, preveniu o dano causado pela ciclofosfamida (CPA) no fígado dos animais tratados. Podemos sugerir que as propriedades antioxidantes da romã demonstram um possível efeito hepatoprotetor contra os danos causados pela CPA, mas futuros estudos *in vitro* serão necessários para avaliar o mecanismo de ação da romã. Da mesma forma, a caracterização química seria necessária para relacionar os compostos biológicos ativos da romã, na qual ainda não foram realizadas para complementar esse estudo.

O nosso estudo mostra que o extrato aquoso da romã não apresentou potencial mutagênico, pois os eventos mutagênicos estão relacionados com os processos carcinogênicos. Patel et al. (2008) avaliaram a toxicidade da romã em camundongos com doses de 60, 240 e 600mg/kg/dia durante 90 dias e os resultados mostraram que não houve nenhuma alteração nos exames clínicos e hematológicos nessas doses testadas.

Por outro lado, a citotoxicidade é um indicativo inicial da atividade antitumoral presente

na maioria dos quimioterápicos. Atualmente, os agentes antitumorais usados clinicamente, na sua grande maioria, possuem marcada atividade citotóxica (AJITH e JANARDTHANAN, 2003). Neste contexto, Oliveira et al. (2010) investigaram, *in vitro*, a citotoxicidade do extrato etanólico do fruto e folha da *Punica granatum* utilizando células K-562 e células do Tumor Ascítico de Ehrlich (TAE), sendo que os resultados dos estudos demonstraram uma redução na viabilidade das células K-562 e do TAE.

Em relação ao tratamento, a Tabela 2 apresenta o peso corpóreo e ganho de peso dos animais durante o período experimental. O grupo tratado com a polpa da romã + CPA apresentou um aumento de peso durante o experimento, o que pode estar relacionado à composição da fruta, pois os frutos da romã são ricos em carboidratos, gordura (semente) e fibras (JARDINI e FILHO, 2007; SANTOS et al., 2010).

Portanto, os indicadores resultantes da avaliação do efeito modulador da *Punica granatum* L. (romã), sobre a clastogenicidade induzida pelo agente alquilante CPA, *in vivo*, nas condições experimentais realizadas, sugerem que o extrato aquoso da polpa da romã possui compostos que atuam significativamente na redução da frequência de células micronucleadas da medula óssea de camundongos Swiss, apresentando dessa forma propriedade antimutagênica da fruta.

**Tabela 2** - Peso corpóreo médio (g) e ganho de peso (média ± SD) de camundongos tratados durante 15 dias com extrato aquoso da *Punica granatum* (romã).

Tratamento	Nº de animais	Peso inicial X±SD	Peso final X±SD	Ganho de peso X±SD
Água + NaCl 0,9% <sup>a</sup>	5	28,03 ± 1,95	38,02 ± 1,15	9,98 ± 2,13
Água + CPA (25mg/Kg) <sup>b</sup>	5	19,5 ± 2,33	30,14 ± 2,14	10,64 ± 0,45
Romã + CPA (25mg/Kg)	5	21,8 ± 5,91	36,34 ± 3,19	14,86 ± 8,19
Romã + NaCl 0,9%	4 <sup>c</sup>	25,35 ± 4,97	34,35 ± 2,84	10,35 ± 5,61

<sup>a</sup> Controle negativo; <sup>b</sup> Controle positivo; <sup>c</sup> 1 animal morreu

### Considerações Finais

Atualmente, sabe-se que o câncer ocupa uma elevada posição em causas de mortes mundialmente, o que tem favorecido o aumento no número de estudos de estratégias e compostos que possam interferir positivamente neste processo. Concomitante a isso, tem crescido também estudos relacionados a compostos presentes na dieta que possam influenciar mecanismos relacionados ao desenvolvimento desta doença.

A *Punica granatum* (romã) é uma fruta que tem sido muito estudada, devido possuir compostos com ação em diversas etapas do desenvolvimento tumoral, na qual sua atuação seja principalmente no retardo da oxidação e síntese de prostaglandinas, inibindo a proliferação de células tumorais, diminuindo a invasão tumoral, promovendo a apoptose celular e inibindo a angiogênese, processos estes de grande importância no desenvolvimento tumoral (TOI et al., 2003).

Neste contexto, o presente estudo mostrou que ao extrato aquoso da romã possui compostos antimutagênicos, com provável potencial quimiopreventivo contra substâncias genotóxicas, podendo atuar na prevenção de danos ao DNA. Em conjunto, sob as condições testadas, camundongos tratados com romã demonstraram ausência de efeito mutagênico. Ressaltando, a importância da realização de futuros estudos *in vitro* para verificar os possíveis mecanismos de ação de seus compostos isolados.

## Referências

- AJITH, T.A, JANARDHANAN, K.K. Cytotoxic and antitumor activities of a polypore macrofungus, *Phellinus rimosus* (Berk) Pilat. **Journal Ethnopharmacol** v. 84, p. 157-162, 2003.
- CARDOSO, C. R. P. **Atividade mutagênica e ativadora da resposta imune celular induzidas por *Byrsonima crassa* Niendezu e *Byrsonima intermédia* A.Juss. (Malpighiaceae)**. Dissertação (Mestrado em Análises Clínicas)- Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araquara, v. 591, f. 126, p. 3-7. Araquara - São Paulo, Brasil, 2006.
- DASSPRAKASH, M.V; ARUN, R.; ABRAHAM, S.K.; PREMKUMAR, K. *In vitro* and *in vivo* evaluation of antioxidant and antigenotoxic potential of *Punica granatum* leaf extract. **Pharm Biol.** v. 50(12), p. 1523-1530, 2012.
- DELMANTO, R. D. et al. Antimutagenic effect of *Agaricus blazei* Murrill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide. **Mutation Research-Genetic Toxicology**, v.496, n.1-2, p.15-21, 2001.
- FERREIRA, F. G. et al. Avaliação de mutagenicidade e antimutagenicidade de diferentes frações e *Pterogyne nitens* (leguminosae) utilizando ensaio de micronúcleo em *Tradescantia pallida*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, vol. 19, n.1A, p.61-7, 2009.
- GIL, A. C. Como elaborar projetos de pesquisa. **Atlas**, 4ª. Ed. São Paulo, 2002.
- GUEMBAROVSKI, R. L.; COLUS, I. M. S. Câncer: uma doença genética. **Genética na escola**. v.3, n.1, p.4-7, 2008.
- HOENSCH, H.P.; KIRCH, W. Potential role of flavonoids in the prevention of intestinal neoplasia: a review of their mode of action and their clinical perspectives. **International of Journal Gastrointestinal of Cancer**, v. 35(3), p. 187-195, 2005.
- HORA, J. J.; MAYDEW, E. R.; LANSKY, E. P.; DWIVEDI, C. Chemopreventive effects of pomegranate seed oil on skin tumor development in CD1 mice. **Journal Med Food**, v. 6(3), p. 157-161, 2003.
- INCA - Instituto Nacional de Câncer 2012. **Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer**. Rio de Janeiro, 2014.
- JARDINI, F. A.; MANCINI FILHO, J. Avaliação da atividade antioxidante em diferentes extratos da polpa e sementes da romã (*Punica granatum*, L.). **Revista Brasileira de Ciências Farmacêutica**. v. 43, n. 1, São Paulo, 2007.
- JOHAR, D.; ROTH, J. C.; BAY, G. H.; WALKER, J. N.; KROCZAK, T. J.; LOS, M. Inflammatory response, reactive oxygen species, programmed (necrotic like and apoptotic) cell death and cancer. **Ann Acad Med Bialostocensis**. v. 49, p. 31-39, 2004.
- KATSUBE N, IWASHITA K, TSUSHIDA T, YAMAKI K, KOBORI M. Induction of Apoptosis in Cancer Cells by Bilberry (*Vaccinium myrtillus*) and the Anthocyanins. **J Agric Food Chem**. v. 51(1), p. 68-75, 2003.
- KAWAIL, S.; LANSKY, E. P. Differentiation-promoting activity of pomegranate (*Punica granatum*) fruit extracts in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Journal Med. Food**. v. 7(1), p. 13-18, 2004.
- KIM, N.D.; MEHTA R.; YU, W.P.; NEEMAN, I.; LIVNEY, T.; AMICHAY, A.; POIRIER, D.; NICHOLIS, P.; KIRBY, A.; JIANG, W.G.; MANSEL, R.; RAMACHANDRAN, C.; RABI, T.; KAPLAN, B.; LANSKY, E. Chemopreventive and adjuvant therapeutic potential of pomegranate (*Punica granatum*) for human breast cancer. **Breast Cancer Res Tr**. v. 71, p. 203-217, 2002.
- LANSKY E. P. et. Al. Possible synergistic prostate cancers suppression by anatomically discrete pomegranate fractions. **Invest New Drug**. v. 23, p. 11-20, Nova Iorque, 2005.
- LANSKY, E. P.; NEWMANN, R. A. *Punica granatum* (pomegranate) and its potential for prevention and treatment of inflammation and cancer. **Journal of Ethnopharmacology**. v 109, p. 177 – 206, 2007.
- LIU, R.H. Potential synergy of phytochemicals in cancer prevention: mechanism of action. **American Society for Nutritional Sciences**. v. 22, p. 3479-3485, Bethesda-MD, 2004.
- MACGREGOR, J.T.; et al. Guidelines for the conduct of micronucleus assay in mammalian bone marrow erythrocytes. **Mutation Research**, v.189, p.103-12, 1987.
- MARTINS, E. Plantas medicinais. Viçosa: UFV, p. 162-163, 1995.
- NAVARRO V.; et. al. Antimicrobial evaluation of some plants used in Mexican traditional medicine for the treatment of infectious diseases. **J Ethnopharmacol**. v. 53, p. 143-147, Irlanda, 1996.
- NEWMANN D. J.; CRAGG G. M.; SNADE K. M.; Natural products as sources of new drugs over the period 1981-2002. **J Nat Prod**. v. 66, p. 1022-1037, 2003.

OLIVEIRA, L. P.; PINHEIRO, R. C.; VIEIRA, M. S.; PAULA, J. R.; BARA, M. T. F.; VALADARES, M. C. Atividade citotóxica e antiangiogênica de *Punica granatum* L., Punicaceae. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v. 20(2), p. 201-207, 2007.

PARK, O. J.; SURH, Y. J. Chemopreventive potential of epigallocatechin gallate and genistein: evidence from epidemiological and laboratory studies. **Toxicology Letter**. v.150, p. 43-56, 2004.

PEREIRA, C. A. B. Teste estatístico para comparar proporções em problemas de citogenética. Apud:

RABELLO-GAY, M. N., RODRIGUES M. A, La R., Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Faculdade de Ciências Agrônomicas - FCA**. p.113-21, São Paulo,1991.

RAFFERTY, J. A.; 1996. Chemoprotection of normal tissues by transfer of drug resistance genes. **Cancer Metast Rev**. v. 15, p. 365-383, Nova Iorque, 1996.

SANTOS, E.H.B; BATISTA, F.P.R.; PEREIRA, L.M.; CAMPOS, L.M.A.; CASTRO, M.S.; AZEVÊDO, L.C. Composição físico-química dos frutos da romã (*Punica granatum* L.). **V CONNEPI**. Maceio-AL, 2010.

SEERAM, N. P.; ADAMS, L. S.; HENNING, S. M.; NIU, Y.; ZHANG, Y.; NAIR, M. G.; HEBER, D. In vitro antiproliferative, apoptotic and antioxidant activities of punicalagin, ellagic acid and a total pomegranate tannin extract are enhanced in combination with other polyphenols as found in pomegranate juice. **Journal Nutr Biochem**. v. 16, p. 360-367, 2005.

SHUKLA, S.; GUPTA, S. Dietary agents in the chemoprevention of prostate cancer. **Nutritional and Cancer**. v. 53(1), p.18-32, 2005.

SYED, D. N.; AFAQ, F.; MUKHTAR, H. Pomegranate derived products for cancer chemoprevention. **Seminars in Cancer Biology**. v. 17, p. 377–385, 2007.

TOI, M.; RAMACHANDRAN, C.; MELNICK, S. J.; IMAI, A.; FIFE, R. S.; CARR, R. E.; OIAKAWA, T.; LANSKY, E. P. Preliminary studies on the anti-angiogenic potential of pomegranate fractions *in vitro* and *in vivo*. **Springer Netherlands**. v. 6 (2), p. 121 – 128, Tóquio/Japão, 2003.

WILLETT, W. C. Balancing life-style and genomics research for disease prevention. **Science**. v. 296, p. 695-98, 2002.