

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**MUTAGENICIDADE DO EXTRATO DE CASCA  
DE *Musa paradisiaca* (MUSACEAE) EM  
CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE  
CAMUNDONGOS *IN VIVO***

CLÁUDIA UMBELINA BAPTISTA ANDRADE

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

**MUTAGENICIDADE DO EXTRATO DE CASCA  
DE *Musa paradisiaca* (MUSACEAE) EM  
CÉLULAS DE SANGUE PERIFÉRICO DE  
CAMUNDONGOS *IN VIVO***

CLÁUDIA UMBELINA BAPTISTA ANDRADE

Dissertação apresentada à Coordenação de  
Pesquisa e Pós-Graduação da Universidade  
José do Rosário Vellano, como requisito  
para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Edson Luís Maistro

UNIVERSIDADE JOSÉ DO ROSÁRIO VELLANO  
COORDENAÇÃO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

A banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a dissertação de Mestrado intitulada "Mutagenicidade do Extrato de Casca de *Musa Paradisiaca* (Musaceae) em Células de Sangue Periférico de Camundongos *In Vivo*", elaborada por Cláudia Umbelina Baptista Andrade e sob orientação do Prof Dr. Edson Luís Maistro, como requisito para obtenção do título de Mestre em Saúde.

Banca examinadora:

---

Prof. Dr. Edson Luís Maistro – Orientador  
Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS

---

Prof. Dr. Carlos Frederico Loidola  
Universidade José do Rosário Vellano - UNIFENAS

---

Prof. Dr. José Maurício S. F. Silva  
Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL

Alfenas, 08 de novembro de 2007.

“

*Dedico este trabalho aos meus pais pelo apoio e otimismo. A minha querida filha e ao meu esposo pela compreensão e incentivo.*

## AGRADECIMENTOS

Ao Senhor, meu Deus...

Ao meu esposo, Eduardo, pelo incentivo e por compreender os momentos de ausência.

À minha filha Gabriela, meu amor incondicional.

Aos meus pais, Dalva e Hildebrando, essências de minha vida, obrigada pelo encorajamento e apoio incansável durante a execução do meu trabalho. Amo vocês!

Aos meus familiares. Obrigada por terem incentivado e apoiado a minha jornada.

Ao Prof. Dr. Edson Luís Maistro, pela capacidade com que acompanhou esta orientação. Obrigada pela confiança e por acreditar em meu potencial.

À Prof. Marlene Leite Godoy Vieira de Souza, pela atenção e compreensão.

À Lucimara, pelo auxílio durante a execução dos experimentos.

Ao Prof. Fábio, pela cooperação na correção deste trabalho.

Aos meus colegas do curso, amigos de quem eu sempre me lembrarei com carinho.

A todas as pessoas que participaram de forma direta ou indireta para o êxito deste trabalho.

A todos vocês minha eterna gratidão.

**LISTA DE FIGURAS**

FIGURA 1 – <i>Musa paradisisaca</i> L.....	45
--	----

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 - Migração do DNA no teste do cometa para avaliar a genotoxicidade do extrato de *Musa paradisiaca* em leucócitos de sangue periférico (coletados 24 h após o tratamento) em camundongos Swiss fêmeas (F) e machos (M) *in vivo*.....57

TABELA 2 - Número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MNPCE) observado em células de sangue periférico de camundongos Swiss em fêmeas (F) e machos (M) tratados com extrato de *Musa paradisiaca* e respectivo grupo controle. Para cada tempo de amostra (48 e 72 h) 2000 células foram analisadas. SDM = desvio padrão da média.....59

## LISTA DE ABREVIATURAS

Agarose LPM – Agarose médio ponto de fusão

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária

Ca - Cálcio

CO<sub>2</sub> – Dióxido de carbono

Cu - Cobre

DMSO - Dimetilsulfóxido

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

ENU - Etil-nitroso-uréia

Fe - Ferro

H<sub>2</sub>O – água

HCl – ácido clorídrico

HTC – células de hepatócito

K - Potássio

Mg - Magnésio

MN - Micronúcleos

MNPCE - Número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos

Na - Sódio

NaF - Fluoreto de sódio

NCE - Eritrócito normocromático

P - Fósforo

PbII – Chumbo inorgânico

PBS – Solução Salina Fosfatada Tamponada

PCE - Eritrócito policromático



Raios UVB – raios ultravioleta tipo B

Raios UVC – raios ultravioleta tipo C

RNA – Ácido Ribonucléico

SBMCTA- Sociedade Brasileira de Mutagênese Carcinogênese e Teratogênese  
Ambiental

SCGE - Single-Cell Gel *Electrophoresis*

TBT -Tributilestanho

USP – Universidade de São Paulo

## RESUMO

ANDRADE, Cláudia Umbelina Baptista. **Mutagenicidade do Extrato de Casca de *Musa Paradisiaca* (Musaceae) em Células de Sangue Periférico de Camundongos *In Vivo***. Orientador: Edson Luís Maistro. Alfenas: UNIFENAS, 2007. Dissertação (Mestrado em Saúde).

As plantas em geral são fontes de muitos produtos com atividades biológicas, e atualmente são de grande interesse para a indústria farmacêutica. *Musa paradisiaca* é uma dessas plantas, cuja casca vem sendo utilizada para tratamento de fissuras na pele, devido ao seu poder cicatrizante, e, devido aos seus altos valores energéticos e nutritivos, também tem servido de alimentação alternativa através da farinha. Visto que nunca foi investigado o efeito da casca desta planta sobre o genoma de mamíferos, foi objetivo deste trabalho analisar o potencial mutagênico do extrato de cascas de *Musa paradisiaca* sobre células sangüíneas de camundongos Swiss *in vivo*. Para esta avaliação, foram utilizados o ensaio cometa e o teste do micronúcleo. Os animais foram separados em cinco grupos de seis animais cada, onde em três deles foram testadas, por via oral, três diferentes concentrações do extrato (1000, 1500 e 2000 mg/kg de peso corpóreo). As células do sangue periférico foram coletadas 24 horas após o tratamento para a realização do ensaio cometa e 48 e 72h para o teste do micronúcleo. Os resultados obtidos com o ensaio cometa mostraram que o extrato de *Musa paradisiaca* induziu aumento estatisticamente significativo na quantidade de danos no DNA dos leucócitos de sangue periférico nas duas maiores concentrações do extrato, e, pelo teste do micronúcleo, um aumento também significativo na média de eritrócitos policromáticos micronucleados nas três doses testadas. A relação de eritrócitos policromáticos e normocromáticos (PCE/NCE) em 1000 células por animal não mostrou diferença significativa em relação ao grupo controle negativo, indicando que o extrato não apresenta citotoxicidade. Com base nas condições do ensaio desenvolvido, os dados obtidos revelaram que o extrato de cascas de *Musa paradisiaca* apresentou efeito mutagênico em células de sangue periférico de camundongos Swiss albinos.

Palavras-chave: *Musa paradisiaca*. SCGE. Teste do micronúcleo. Células de Sangue Periférico. Ensaio Cometa.

## ABSTRACT

### **Mutagenicity of the *Musa paradisiaca* (Musaceae) fruit peels extract in mice peripheral blood cells *in vivo***

Plants are a source of many biologically active products and nowadays they are of great interest to the pharmaceutical industry. In the present study, the mutagenic potential of the fruit peels extract from *Musa paradisiaca* was assessed using the single cell gel electrophoresis (Comet assay) and micronucleus assays. Animals were treated orally with three different concentrations of the extract (1000, 1500 and 2000 mg/kg of body weight). Peripheral blood cells of Swiss mice were collected 24 h after the treatment for the comet assay and 48 and 72 h for the micronucleus test. The results showed that the extract of *M. paradisiaca* induced statistically significant increases in the average numbers of DNA damage in peripheral blood leukocytes for the two higher doses and a significant increase in the mean of the micronucleated polychromatic erythrocytes at three tested doses. The polychromatic/normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE) scored in the tested groups was not statistically different from the negative control, showing that the extract presented no cytotoxic effects. The data obtained indicate that fruit peels extract from *M. paradisiaca* showed mutagenic effect in the peripheral blood cells of Swiss albino mice.

Keywords: *Musa paradisiaca*. SCGE Micronucleus test. Peripheral blood cells. Comet assay.

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>15</b>
<b>2.1</b>	<b>GERAL.....</b>	<b>15</b>
<b>2.2</b>	<b>ESPECÍFICOS.....</b>	<b>15</b>
<b>3</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>16</b>
<b>4</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1</b>	<b>CONSIDERAÇÕES SOBRE MUTAGÊNESE.....</b>	<b>17</b>
<b>4.1.1</b>	<b>Agentes Mutagênicos.....</b>	<b>21</b>
<b>4.2</b>	<b>CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TESTES DE MUTAGENICIDADE..</b>	<b>22</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Teste do Micronúcleo.....</b>	<b>23</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Teste do Cometa - Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE).....</b>	<b>31</b>
<b>4.3</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE FITOTERAPIA.....</b>	<b>37</b>
<b>4.4</b>	<b>CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE <i>Musa paradisiaca</i>.....</b>	<b>39</b>
<b>4.4.1</b>	<b>Cultura da Banana.....</b>	<b>40</b>
<b>4.4.2</b>	<b>Nomenclatura da Banana.....</b>	<b>41</b>
<b>4.4.3</b>	<b>Características.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4.4</b>	<b>Estudos científicos utilizando a Casca da Banana.....</b>	<b>45</b>
<b>5</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1</b>	<b>MATERIAL.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.1</b>	<b>Material vegetal e obtenção do extrato da <i>Musa paradisiaca</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>5.1.2</b>	<b>Animais utilizados no estudo.....</b>	<b>48</b>
<b>5.2</b>	<b>MÉTODOS.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.1</b>	<b>Avaliação de genotoxicidade.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.1.1</b>	<b>Os grupos experimentais.....</b>	<b>49</b>
<b>5.2.2</b>	<b>Protocolo para aplicação do ensaio do cometa (SCGE) para detecção de danos de DNA em células de eucariotos.....</b>	<b>50</b>
<b>5.2.2.1</b>	<b>Preparo das soluções.....</b>	<b>51</b>
<b>5.2.2.2</b>	<b>Preparo de células.....</b>	<b>51</b>

5.2.2.3	Preparo das lâminas.....	51
5.2.2.4	Eletroforese e coloração.....	52
5.2.2.5	Avaliação dos danos ao DNA.....	53
5.2.3	<b>Protocolo para o teste do micronúcleo.....</b>	<b>54</b>
5.3	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA.....</b>	<b>55</b>
5.4	<b>ASPECTO ÉTICO.....</b>	<b>55</b>
6	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>56</b>
7	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>62</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>63</b>
	<b>ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA</b>	<b>71</b>
	<b>APÊNDICE B – ARTIGO CIENTÍFICO.....</b>	<b>72</b>

Andrade, Cláudia Umbelina Baptista  
Mutagenicidade do extrato de casca de *Musa paradisiaca*  
(musaceae) em células de sangue periférico de camundongos  
*in vivo* Cláudia Umbelina Baptista Andrade.–  
Alfenas:UNIFENAS, 2007.  
87f.  
Orientador: Prof. Dr. Edson Luis Maistro  
Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade José do  
Vellano.  
1. *Musa paradisiaca*. 2. SCGE. 3. Teste Micronúcleo. 4.  
Células de sangue periférico. 5. Ensaio cometa. I. Título.

CDU: 616.15(043)

## 1 INTRODUÇÃO

O constante contato do homem com compostos químicos, físicos, poluição e a agitação da vida moderna apresenta riscos potenciais para a saúde. Visando melhorar as condições de vida, o uso de produtos naturais, para cura de moléstias ou prevenção, têm aumentado muito, aguçando desta forma, o interesse da comunidade científica no sentido de confirmar o potencial medicinal desses produtos, seus compostos e como agem.

A vulnerabilidade do material genético a agressões impostas pelo ambiente fez com que surgisse uma nova área de pesquisa - a genética toxicológica. Esta é uma das áreas da ciência que tem se dedicado à pesquisa das propriedades mutagênicas e antimutagênicas desses produtos, fazendo uso de diversos sistemas de testes. Estes ensaios avaliam diferentes tipos de danos causados ao DNA.

Uma das propriedades da genética toxicológica é que a molécula alvo, o DNA, quando atingida por um agente genotóxico, torna-se uma testemunha, uma prova circunstancial, do efeito genotóxico testado. Assim, habilita-se como uma “memória” para testes de genotoxicidade. Entende-se genotoxicidade como qualquer dano causado à molécula de DNA.

O teste do micronúcleo é o ensaio, *in vivo*, mais amplamente utilizado para a detecção de agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). O ensaio é internacionalmente aceito como parte da bateria de testes recomendada para a avaliação do potencial mutagênico e para o registro de novos produtos químicos que entram anualmente no mercado mundial. Este teste foi desenvolvido, de início, em

eritrócitos de medula óssea de camundongos, sendo também realizado em ratos (TAKAHASHI *et al.*, 2004).

O teste do cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido às suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação.

A casca de *Musa paradisiaca* (banana) vem sendo utilizada para tratamento de fissuras devido ao seu poder cicatrizante e como alimentação alternativa através da farinha, devido aos seus altos valores energéticos e nutritivos. Apesar de sua prática comum entre a população, não há estudos que comprovem a segurança do seu uso.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 GERAL

Analisar a biossegurança com relação ao genoma do extrato bruto de cascas maduras de frutos de *Musa paradisiaca* através de ensaios *in vivo*, no Laboratório de Genética da UNIFENAS campus Alfenas.

### 2.2 ESPECÍFICOS

- Investigar o potencial clastogênico e/ou aneugênico do extrato bruto de cascas maduras de frutos *Musa paradisiaca* em eritrócitos de sangue periférico de camundongos *Swiss in vivo* pelo Teste do Micronúcleo.
- Investigar o potencial genotóxico do extrato bruto de cascas maduras de frutos de *Musa paradisiaca* em leucócitos do sangue periférico de camundongos *Swiss in vivo* através do Ensaio Cometa.

### 3 JUSTIFICATIVA

Produtos naturais têm sido muito utilizados na medicina popular, devido à convicção de que estes apresentariam efeitos adversos insignificantes. Sendo assim, saber sobre o potencial benéfico ou prejudicial desses produtos utilizados por populações humanas, tem grande importância para saúde pública (BARBISAN *et al.*, 2002).

Os estudos capazes de identificar substâncias potencialmente mutagênicas fazem-se muito necessários na atualidade, uma vez que o homem está exposto a um número crescente de agentes químicos e físicos que podem constituir um risco à sua saúde. Estes agentes presentes no ambiente podem agredir o material genético, resultando em mutações e até mesmo alterações correlacionadas, como oncogênese.

Mutações e oncogênese estão estreitamente relacionadas, pois ambas representam alterações abruptas e permanentes no material genético de uma única célula.

Este trabalho avaliou o potencial mutagênico do extrato da casca da *Musa paradisiaca* (banana) por intermédio de dois sistemas-teste *in vivo*, uma vez que essa casca tem sido usada, em larga escala, em várias regiões do mundo, para fins nutricionais e medicinais, sem, no entanto, ter sido suficientemente investigada cientificamente quanto à sua biosegurança em relação ao genoma de mamíferos.

## **4 REVISÃO DE LITERATURA**

### **4.1 CONSIDERAÇÕES SOBRE MUTAGÊNESE**

Durante a evolução da célula, formou-se uma molécula, que hoje sabemos ser o ácido desoxirribonucléico (DNA): molécula longa, formada pela junção de um grande número de nucleotídeos, e que contém a informação genética codificada. O DNA constitui uma espécie de código que determina o que uma célula tem. Além disso, o DNA é capaz de produzir uma cópia dele mesmo. Os cromossomos contêm os genes que, por sua vez, são formados por DNA. Estes genes permitem a transmissão das informações genéticas de geração a geração (VINÍCIUS, 2007).

O material responsável pelo comando e coordenação de toda a atividade celular e pelas divisões celulares e transmissões das características hereditárias está representado nas células pelos cromossomos (ALBERTS, 2007).

Nas células eucarióticas, o cromossomo é formado por DNA associado a moléculas de histona, que são proteínas básicas. É na molécula de DNA que estão contidos os genes, responsáveis pelo comando da atividade celular e pelas características hereditárias (VINÍCIUS, 2007).

De acordo com o autor acima, a molécula de DNA é constituída por uma seqüência de nucleotídeos, que, por sua vez, são formados cada um por três diferentes tipos de moléculas: um açúcar (pentose), um grupo fosfato e uma base nitrogenada. Para a formação da molécula de DNA, é necessário que ocorra a

ligação entre os nucleotídeos. Os nucleotídeos estão ligados covalentemente por ligações fosfodiéster formando entre si pontes de fosfato.

Cada espécie existente, seja ela animal ou vegetal, possui um conteúdo cromossômico que é responsável pela hereditariedade das características próprias do tipo de organismo estudado. Estes conteúdos chamam-se *genomas* e dão a cada espécie um número característico de cromossomos. A espécie humana tem seu genoma distribuído em 46 cromossomos, sendo 44 destes autossomos e 2 sexuais. Às vezes, porém, podem ocorrer acidentes ambientais ou biológicos, que ocasionam irregularidades na divisão celular, atingindo os cromossomos interfásicos, de modo que pode haver alterações no genoma do indivíduo. Alterações que afetam a estrutura molecular do DNA são chamadas de mutações (KAVALCO, 1999).

O DNA de um organismo não é uma molécula estática. Frequentemente suas bases estão expostas a agentes naturais ou artificiais, que provocam modificações na sua estrutura ou composição química. Modificações súbitas e hereditárias no material genético são denominadas mutações (ZAHA, 1996).

Mutante é todo organismo que exhibe uma forma alterada como resultado da presença de uma mutação; esta pode ser definida como uma alteração herdável na seqüência de nucleotídeos do DNA.

A mutação é uma alteração súbita e herdável na estrutura do material genético e como tal, é uma fonte extremamente importante de variabilidade genética nas populações de seres vivos (BURNS & BOTTINO, 1991). Entretanto, em curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia

extremamente complexos e finamente sintonizados de um organismo (ALBERTS *et al.*, 2006).

No decorrer da vida, o DNA sofre alterações, que podem ser causadas por erros durante a duplicação do DNA, na divisão celular. O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Sem mutação não haveria evolução. Muitas das mutações não implicam mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou organismo e, portanto, passam despercebidas. Outras mutações podem determinar a morte celular e, por consequência, não são também detectáveis. Assim, apenas um pequeno número de mutações que ocorrem em genes específicos pode determinar de um lado, vantagens, e por um outro, um crescimento desordenado das células (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Para que haja mutação, é necessário que haja anteriormente um dano na seqüência de nucleotídeos do DNA. As células possuem um arsenal de mecanismos de reparo do DNA, que são encarregados de anular o dano, mas, ocasionalmente, pode ocorrer uma falha nesses mecanismos, favorecendo a replicação celular nessas condições (WIKIPEDIA, 2006). As células replicadas com danos de DNA raramente persistem e apenas uma pequena proporção de células sobrevive carregando danos genéticos da célula mãe. Com isso, passam a apresentar essas novas características.

As mutações podem ter origens diversas. Podem ser ocasionais, tomando parte na pequena probabilidade de erro espontâneo no momento da duplicação do DNA, na mitose ou na meiose; podem ser provocadas por agentes mutagênicos e ainda induzidas em laboratório com o uso intencional destes mesmos agentes sobre organismos vivos (WIKIPEDIA, 2006).

Mutação é toda alteração do material genético de uma célula que não resulta de segregação e recombinação. Quando não é letal para a própria célula, ela pode propagar-se pelo corpo em crescimento (mutação somática) ou transmitir-se a gerações seguintes (mutação germinativa). A mutação pode ser espontânea ou induzida por agentes físicos, químicos ou biológicos, incluindo células somáticas, podendo levar a um processo carcinogênico no próprio indivíduo. Se ocorrer em células germinativas, pode produzir doenças ou malformações nas gerações futuras (GRIFFITHS *et al.*, 2002). Segundo o mesmo autor, durante a gestação, agentes físicos, químicos ou biológicos podem interferir no desenvolvimento normal do feto, causando alterações morfológicas e fisiológicas, denominadas efeitos teratogênicos.

Portanto, os mecanismos de mutagênese e carcinogênese parecem estar intrinsecamente ligados. A mutação é uma consequência do dano no DNA e este pode ser estágio inicial no processo pelo qual a maioria dos carcinógenos químicos inicia a formação do tumor. As causas do câncer são variadas, podendo ser endógenas ou exógenas, estando, no entanto, interrelacionadas (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Com o objetivo de salvar o ambiente contra agentes mutagênicos e carcinogênicos, as agências internacionais e instituições governamentais despertaram para o perigo desses agentes para a população humana, recomendando, assim, uma série de testes regulatórios. Um número de testes de curta duração está disponível para a avaliação do perigo genético. Esses modelos são frequentemente categorizados pelos indicadores biológicos que avaliam, ou seja: mutação gênica, dano cromossômico ou lesão no DNA (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Enquanto existe pouca ou nenhuma dúvida de que os testes de genotoxicidade devem fazer parte de um sistema de avaliação de todos os novos agentes químicos, físicos e biológicos, o sistema de teste apropriado, bem como o modelo de protocolo, tem sido frequentemente determinados pelas diretrizes regulatórias internacionais (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Portanto, uma vez que as mutações são frequentemente associadas com o desenvolvimento do câncer e defeitos ao nascimento, o conhecimento do potencial genotóxico de um agente químico, físico ou biológico é uma informação essencial para as agências regulatórias no que se refere ao conhecimento de risco para o homem (RABELO-GAY *et al.*, 1991).

#### **4.1.1 Agentes Mutagênicos**

Agente mutagênico é todo agente físico, químico ou biológico que, em exposição às células, pode causar mutação, ou seja, um dano na molécula de DNA que não é reparado no momento da replicação celular, sendo passado para gerações seguintes (WIKIPEDIA, 2006).

Os agentes mutagênicos alteram a seqüência das bases de DNA. Assim, podem acelerar ou aumentar o aparecimento de mutações que estão associadas ao desenvolvimento de neoplasias (BROWN, 1999).

Segundo Jones e Gaudin (2006), os agentes mutagênicos podem ser:

- Físicos: radiação ionizante e raios UVC, capazes de destruir as ligações químicas entre os nucleotídeos (mutações são mais raras nesses casos, pois

a destruição da cadeia de DNA geralmente provoca a morte celular), e UVB, cujo espectro é absorvido pelo DNA. Os danos destes agentes são grandemente amplificados em presença de água e oxigênio;

- Químicos: inúmeras substâncias ditas cancerígenas, que atuam danificando ligações químicas, ou mesmo substituindo nucleotídeos normais por moléculas análogas. Radicais livres também atuam catalizando reações químicas danosas ao DNA;
- Biológicos: ação de vírus e bactérias, que injetam parte de seu DNA na célula hospedeira, ocasionalmente integrando-a à cadeia de DNA do hospedeiro. Também podem haver mutações por falhas de ordem genética.

Os agentes mutagênicos podem causar diferentes tipos de danos de DNA. Os agentes clastogênicos são aqueles que quebram cromossomos, e agentes aneugênicos são agentes que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal. A investigação de agentes com essa potencialidade é imprescindível no sentido de monitorar e evitar gênese de tumores em seres humanos.

## **4.2 CONSIDERAÇÕES SOBRE OS TESTES DE MUTAGENICIDADE**

Os testes regulatórios de genética Toxicológica se constituem em uma série de testes de mutagenicidade, bem definidos, selecionados para detectar agentes químicos e físicos capazes de induzir mutações.

Estes métodos para detecção de mutações são escolhidos e utilizados dependendo: a) da finalidade do estudo; b) do tipo de material a ser avaliado; c) do nível de informação que se deseja obter; d) e das condições laboratoriais existentes.



A determinação de qual o sistema-teste e que parâmetros a serem avaliados são mais adequados é uma etapa fundamental em projetos de mutagenicidade. Entretanto, as diferenças na organização do material genético das células, quando se comparam sistemas em microrganismos, vegetais e animais, fazem dos sistemas de mamíferos os mais aceitáveis para se tentar fazer uma extrapolação dos resultados obtidos para os possíveis efeitos causados ao homem (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

Testes com animais no laboratório oferecem grandes vantagens no estudo do potencial mutagênico de um composto. A primeira é, sem dúvida, o metabolismo do animal, que nunca pode ser totalmente reproduzido num sistema *in vitro*. No organismo intacto, podemos utilizar as condições de exposição a que o homem está sujeito, seja quanto à via de administração, duração do tratamento (agudo ou crônico) ou condições nutricionais. Outro aspecto importante é a especificidade do órgão alvo quanto à atividade mutagênica da substância em estudo. Um mesmo animal pode ser utilizado por vários testes, dando informação sobre diferentes tipos de danos genéticos (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

As técnicas utilizadas neste trabalho, o teste do micronúcleo e o ensaio cometa, são reconhecidas pela comunidade científica internacional como tendo boa reprodutividade, especificidade e sensibilidade.

#### **4.2.1 Teste do Micronúcleo**

O teste de micronúcleo em roedores *in vivo* é amplamente aceito pelas agências internacionais e instituições governamentais, como parte da bateria de

testes recomendadas para estabelecer a avaliação e o registro de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Segundo os mesmos autores, o procedimento original para o Teste do Micronúcleo foi desenvolvido por Schmid *et al.*: Matter e Schimid em 1971; Nichols e colaboradores em 1972 e Schimid em 1971 e, subseqüentemente, modificado por Heddle e colaboradores: Heddle em 1973, Salomone e colaboradores em 1980 e Heddle e Salomone em 1981.

O teste do micronúcleo é o ensaio *in vivo* mais amplamente utilizado para detectar agentes clastogênicos (que quebram cromossomos) e agentes aneugênicos (que induzem aneuploidia ou segregação cromossômica anormal). Foi inicialmente desenvolvido em eritrócitos de medula óssea de camundongos, mas é também realizado em ratos (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

As características básicas do teste são: (1) o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados (PCEs); (2) o eritrócito policromático tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente; (3) os micronúcleos são facilmente identificáveis e a sua distribuição é bem definida; e (4) a freqüência de micronúcleo induzida em eritrócito policromático é dependente do tempo de amostragem (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Os eritroblastos, na medula óssea, sofrem uma duplicação final dos cromossomos e se diferenciam em eritrócitos policromáticos. Os micronúcleos (MN) aparecem nas células filhas, em decorrência de danos induzidos nas células precursoras. Os fragmentos cromossômicos que resultam de quebras podem ser

incorporados no núcleo principal das células filhas após a mitose. Uma membrana nuclear se formará em volta do fragmento, o qual será visível como um pequeno núcleo separado do núcleo principal da célula (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Os micronúcleos – um ou vários por célula - resultam de fragmentos cromossômicos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em relação aos demais em sua migração para os pólos da célula na anáfase (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

Micronúcleos são núcleos pequenos, separados e adicionais ao núcleo principal da célula, produzidos durante a telófase da mitose por perda de fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros (SBMCTA, 2007).

Eritrócito policromático (PCE) é um eritrócito imaturo, em um estágio intermediário de desenvolvimento, que ainda contém ribossomos e, portanto, pode ser distinguido do eritrócito normocromático (NCE) por coloração seletiva para ribossomos (SBMCTA, 2007).

Heddle e Carrano (1977) mediram o conteúdo de DNA de micronúcleos induzidos por radiação gama na medula de camundongo e mostraram que esse conteúdo variou de 0.5% a 11.1% no núcleo diplóide em G1, com média de 3.5%. Tais resultados estão de acordo com o esperado, na hipótese de que os micronúcleos surgem de fragmentos acêntricos produzidos por quebra ao acaso do genoma do animal.

Segundo o procedimento original descrito por Heddle (1973) e Schmid (1976), os micronúcleos são contados nos eritrócitos jovens. Quando os eritroblastos expõem seu núcleo, ao se transformarem em eritrócitos, os micronúcleos permanecem no citoplasma onde são facilmente reconhecíveis. Durante um período de 10 a 24 horas, os eritrócitos jovens são policromáticos (RNA positivos), isto é,

coram-se em azul e não em vermelho. Se contarmos os micronúcleos apenas nesse tipo de célula, saberemos que eles se formaram na mitose anterior, na presença do agente mutagênico. Como o período entre a última divisão e a formação do eritrócito policromático é de 8 a 12 horas, é obvio que só vai encontrar micronúcleos induzidos pelo agente cerca de 10 horas após o tratamento. Além disso, o intervalo mínimo dentro do qual os micronúcleos podem ser detectados corresponde à duração do estágio de policromático, entre 10 a 24 horas. Os micronúcleos são tipicamente arredondados, com diâmetro de 1/20 a 1/5 do diâmetro do eritrócito. Correspondem ao que se denomina, em hematologia, de corpúsculo de Howell-Jolly. A taxa espontânea de eritrócitos policromáticos com micronúcleo é baixa e consistente, cerca de três por mil células.

Recomenda-se usar animais entre 7 a 12 semanas de idade, 5 para cada dose, e contar 1000 eritrócitos policromáticos por animal. Outra possibilidade é contar 2000 eritrócitos porque, como a passagem de eritrócito policromático a maduro, normocromático, é um processo contínuo, a decisão de contar um eritrócito em transição como jovem ou adulto, é mais ou menos subjetiva (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

As substâncias a serem testadas são, geralmente, administradas a roedores, e o efeito verificado em esfregaço de medula óssea ou células de sangue periférico. Este ensaio serve como primeiro passo no estudo de compostos mutagênicos, tendo a vantagem de ser mais rápido que a análise de aberrações cromossômicas.

O ensaio de micronúcleo *in vivo* é descrito por Schmid (1974), sendo uma técnica simples e rápida na preparação e leitura das lâminas, porém não exato como a análise das aberrações cromossômicas. No monitoramento da quebra de cromossomos, o teste de micronúcleo não é tão sensível como o teste da metáfase

de medula óssea, porém, é um método de rotina toxicológico amplamente apropriado para detectar a genotoxicidade de um composto.

São inúmeros os trabalhos utilizando a técnica do micronúcleo para a avaliação de mutagenicidade e/ou antimutagenicidade de diversos produtos aos quais os seres humanos estão expostos.

A análise do potencial mutagênico do tributyltin (TBT) e ligação inorgânica (PbII), utilizando o teste do micronúcleo, revelou seu potencial genotóxico em *Hoplias malabaricus*, utilizando dose de 0,3 mg/g de peso de TBT e 21mg/g de peso de PbII (FERRARO *et al.*, 2003).

Scher *et al.* (2000), analisando o potencial genotóxico do Saião, planta cujo extrato é amplamente utilizado com antiinflamatório por seres humanos, relatou que o extrato aquoso da referida planta não apresentou ação mutagênica em camundongos pelo teste de micronúcleo.

Rampazo *et al.* (2002) observaram pelo teste do micronúcleo um efeito protetor da Clorofilina, um sal obtido da clorofila, contra mutações induzidas pela mitomicina C *in vitro* em células de *hamster* chinês.

A análise do pesticida Carbofuran e seus quatro metabólitos (carbofuranphenol, 3- Ketocarbofuran, 3-hidrocarbofuran e nitrosocarbofuran) nas doses de 0,1 e 0,4 mg/Kg, testados em ratos por via intraperitoneal, sendo utilizado o teste de micronúcleo e cometa. Os resultados mostraram que 3- Ketocarbofuran, 3-hidrocarbofuran e nitrosocarbofuran são potencialmente mutagênicos. (LUY *et al.*, 2005).

No estudo realizado por Delmanto *et al.* (2000), os mesmos demonstraram que o chá de cogumelo *Agaricus blazei*, conhecido como cogumelo do sol, possui efeito

protetor contra mutagenicidade da ciclofosfamida em camudongos, através da análise de micronúcleos.

A palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) é uma planta muito utilizada no nordeste brasileiro, inclusive para alimentação humana. Devido à enorme importância, Neto *et al.* (2005) avaliaram o efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) através do teste de micronúcleos em ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) *in vivo*. No experimento foram delineados 4 grupos experimentais, aos quais foram administrados: ciclofosfamida (controle positivo), soro fisiológico (controle negativo), palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) e a palma forrageira (*Opuntia ficus-indica*) com a ciclofosfamida. Depois de 24 horas, procedeu-se ao teste do micronúcleo. Apenas a ciclofosfamida teve efeito mutagênico com uma frequência de média = 7,6 MNs/1000 PCEs. Com a palma forrageira (*Opuntia ficus-indica* Mill) essa frequência variou entre 1,5 e 3 MNs/1000 PCEs, que é considerado normal. Quando analisada a palma da fogueira (*Opuntia ficus-indica* Mill) com a ciclofosfamida, obteve-se média de 1,75 micronúcleo para cada 1000 PCEs observados. E uma média de 87,25 NCEs/200 PCEs. Levando-se em conta a frequência normal de micronúcleos, tem-se que, quando colocada com a Ciclofosfamida, a palma forrageira inibiu consideravelmente a ação mutagênica. Portanto, a palma forrageira não tem efeito mutagênico, sendo também antimutagênico.

Ferreira *et al.* (2003), avaliaram o potencial antimutagênico do extrato de *Solanum melongena*, a berinjela, frente ao quimioterápico doxorubicina, utilizando os testes citogenéticos de análise de aberrações cromossômicas em metáfases de medula óssea, e também o teste do micronúcleo, e demonstraram que os animais que receberam o extrato de *Solanum melongena* tiveram uma redução

estatisticamente significativa dos efeitos clastogênicos causados pelo referido quimioterápico.

Hayashi *et al.* (1991), executaram o teste do micronúcleo usando reticulócitos de sangue periférico de ratos tratados com ciclofosfamida e mitomicina C. Até então, acreditava-se que o sangue periférico de ratos eram inviáveis para a realização do teste do micronúcleo. No protocolo, foi aplicado um método de coloração com revestimento das lâminas com o corante laranja de acridina. Os ratos foram tratados com mitomicina C ou ciclofosfamida. Foram coletados 5 microlitros de sangue, em intervalos de 0 a 72h após o tratamento. Para comparação, os autores utilizaram a técnica do micronúcleo com células de medula óssea, sacrificando os animais 30 horas após o tratamento. Os autores observaram que os reticulócitos periféricos de ratos também podem ser usados como células-alvo para o ensaio do micronúcleo, com resultados confiáveis.

Zanoni *et al.* (2005) observaram efeito clastogênico do extrato de caule de *Austroplenckia populnea*, utilizando os testes do micronúcleo e de aberrações cromossômicas. O extrato vem sendo estudado quanto ao seu potencial de reduzir a produção de espermatozóides. Os resultados obtidos evidenciaram potencial clastogênico do mesmo em células de ratos *Wistar*, sendo que, por sugestão dos autores, o seu uso por seres humanos deve ser interrompido até que sejam feitas investigações adicionais.

Maistro *et al.* (2005) avaliaram o potencial mutagênico do óleo essencial de *Copaifera duckey* em células de ratos *Wistar*, utilizando a análise de aberrações cromossômicas em células da medula óssea e o teste do micronúcleo em células de sangue periférico. O estudo demonstrou efeito citotóxico do óleo em altas concentrações.

Espósito *et al.* (2005) investigaram o potencial mutagênico do extrato hidroalcoólico bruto de *Hypericum brasiliense*, combinando o teste do micronúcleo com a análise de aberrações cromossômicas em células da medula óssea de ratos *Wistar* e não observaram aumento significativo de mutações nas concentrações testadas.

Este teste deve ser usado em conjunto com outros testes, considerando-se algumas desvantagens do teste do micronúcleo. Uma destas desvantagens a ser considerada é que o teste do micronúcleo não é suficientemente sensível, pois grande parte das substâncias que dão resultados positivos é detectada em doses muito próximas da dose máxima que pode ser testada, isto é, perto da dose que mata o animal (RABELLO-GAY *et al.*, 1991).

É recomendável que seja utilizada mais uma outra técnica junto com o teste do micronúcleo. Duas técnicas sendo avaliadas no mesmo animal têm diversas vantagens, tais como reduzir o número de animais, esclarecer respostas clastogênicas marginais de agentes e correlacionar resultados de genotoxicidade de técnicas diferentes.

Bucker (2006), com o objetivo de realizar um estudo sobre mutagenicidade e genotoxicidade em peixes da espécie *Eingenmannia virescens*, pela exposição ao benzeno, utilizaram as técnicas de frequência de micronúcleos e o ensaio cometa. Foram coletadas amostras de sangue de 10 peixes em diferentes tempos de exposição TO, 24h, 48h, 72h, 96h e 360h (15 dias). Para análise das lâminas do teste do micronúcleo, foram coletadas mil células e estipulada a frequência de ocorrência de micronúcleos. Para a análise do ensaio cometa, a contagem foi feita estipulando-se 4 classes de danos: I, II, III, IV, sendo atribuídas a cada uma os valores numéricos (escores) de 0 a 3, respectivamente, para fins de análises



estatísticas. Os autores verificaram diferenças significativas em relação ao controle para a soma dos escores em todos os tempos de exposição. No teste do micronúcleo não foi possível detectar efeitos mutagênicos significativos nos eritrócitos analisados. No entanto, para o ensaio cometa, os resultados sugeriram ação genotóxica do benzeno.

Segundo Ribeiro, Salvadori e Marques (2003), quando se compara o teste do micronúcleo com o teste de aberrações cromossômicas em medula óssea *in vivo*, o teste do micronúcleo é tecnicamente mais simples, pode ser utilizado em menor tempo, tem um resultado menos subjetivo, detecta agentes clastogênicos e aneugênicos, requer menor número de animais e pode ser automatizado para análise de micronúcleo por análise de imagem e citometria de fluxo. Assim, é um teste muito apropriado para ser usado rotineiramente.

Os resultados positivos obtidos com o teste do micronúcleo fornecem fortes evidências de genotoxicidade sistêmica da substância química avaliada. Sob condições experimentais apropriadas (isto é, quando ocorre exposição da medula óssea), os resultados negativos suportam a conclusão de que a substância teste não é genotóxica *in vivo*. (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

Conforme citado e exemplificado através de relatos de pesquisas, o teste de micronúcleo é um método eficazmente desenvolvido, primariamente para avaliar a habilidade de substâncias para induzir dano cromossômico estrutural e /ou numérico em células em estágio de divisão.

#### **4.2.2 Teste do Cometa - Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)**

O teste do cometa (*single cell gel eletrophoresis* – SCGE) visa evidenciar a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é submetido a uma corrente eletroforética, produzindo figuras semelhantes a um cometa.

Os primeiros pesquisadores que utilizaram a quantificação direta do DNA em células individuais foram Rydenberg e Johanson em 1978 (TICE, 1995). Östling e Johanson, em 1984, incluíram no teste a eletroforese em pH semineutro (pH 9,5), o que permitiu um aumento na sensibilidade (TICE, 1995). A eletroforese em pH alcalino (pH>13) foi introduzida por Singh *et al.* (1988), e transformou o cometa em uma técnica poderosa na detecção de quebras no DNA e de danos em sítios álcil-lábeis, *in vivo* e *in vitro*.

O ensaio cometa vem sendo proposto para estudos de toxicogenética devido a suas peculiaridades e vantagens quando comparado a outros testes para detecção de substâncias genotóxicas. Não é utilizado para detectar mutações, mas sim lesões genômicas que, após serem processadas, podem resultar em mutação. Diferentemente das mutações, as lesões detectadas pelo teste do cometa são passíveis de correção. Assim sendo, o teste pode ser utilizado para estudos de reparo do DNA, trazendo informações importantes sobre a cinética e o tipo de lesão reparada, embora não possibilite inferir a fidedignidade do processo de reparo. Uma vez que danos no DNA são frequentemente célula e tecido-específicos, uma metodologia como o teste do cometa, que permite a detecção de danos e seu reparo em uma única célula, e conseqüentemente, em determinada subpopulação celular, é

de extrema relevância para a avaliação de compostos genotóxicos (RIBEIRO, SALVADORI & MARQUES, 2003).

De acordo com Rojas, Lopez e Valverde (1999), o ensaio cometa é um teste rápido, simples na execução, não requer grande quantidade de amostra da substância teste, pode ser aplicado em diferentes tecidos dos quais se obtém suspensões de determinadas células, é acessível financeiramente, além de ser considerado um ensaio de alta sensibilidade e especificidade.

O ensaio cometa combina a simplicidade, sensibilidade, baixo custo e análise de dados estatísticos confiáveis (TICE *et al.*, 2000).

Segundo Hartmann *et al.* (2001), o ensaio cometa é amplamente usado industrialmente para testes de genotoxicidade *in vitro* e também é uma importante ferramenta para a avaliação do potencial genotóxico de compostos *in vivo*. Durante o desenvolvimento de cada droga, os ensaios de seleção antecipam os resultados dos testes regulatórios. Para isto, o ensaio do cometa é uma ferramenta promissora.

De maneira geral, o teste envolve a deposição de células em agarose, sobre uma lâmina de microscópio, seguido de lise, desnaturação do DNA e eletroforese em pH alcalino (pH >13), e, finalmente, a análise dos cometas gerados pelo DNA fragmentado. Embora o teste seja amplamente aplicado, as técnicas de isolamento celular e condições do experimento nas quais os testes são conduzidos, variam consideravelmente. Variáveis técnicas podem afetar a sensibilidade do teste, tais como a natureza química e o mecanismo de ação do agente mutagênico, a concentração e quantidade de agarose LMP, composição da solução de lise e tempo de lise, tempo de desnaturação alcalina do DNA, composição e temperatura do tampão de eletroforese e as condições de corrida, a coloração do DNA, entre outros (OLIVE *et al.*, 1992; SPEIT & HARTMANN, 1999). O DNA maior e mais pesado que

o restante dos componentes ocupará o espaço no gel anteriormente preenchido por toda a célula, permanecendo retida uma estrutura residual semelhante a um núcleo, designada como nucleóide. Portanto, o nucleóide é uma série de alças superenoveladas de DNA, desprovidas de histonas, aderidas à matriz celular residual, do tamanho do núcleo da célula. Caso existam quebras na molécula de DNA, a estrutura do nucleóide sofre mudança, visto que as alças de DNA se desenovelam formando um halo (COOK & BRAZELL, 1976).

A aparência de cada nucleóide quando submetido à eletroforese, ou seja, com seu DNA danificado migrando em direção ao ânodo, levou Olive, em 1989, a sugerir o nome de “comet assay” (ensaio cometa) para identificar o teste que ficou também conhecido pelo nome de *Single-Cell Gel Eletrophoresis* (SCGE). Neste ensaio, para a interpretação dos resultados, o cometa é dividido em duas partes: “cabeça” e “cauda”. Assim, células sem ou com pouco dano no DNA não apresentariam cauda, permanecendo similares aos nucleóides, enquanto células com mais danos apresentariam caudas maiores (TICE, 1995).

Os cometas gerados pela técnica podem ser analisados visualmente, utilizando-se coloração com um agente intercalante fluorescente (brometo de etídio) e um microscópio de fluorescência (KOBAYASHI, 1995). Desta forma, os cometas poderão ser classificados em: (classe 0) ausência de cauda; (classe 1) núcleos com cauda menor que o diâmetro do núcleo; (classe 2) núcleos com cauda de tamanho entre 1 a 2 vezes o diâmetro do núcleo; (classe 3) núcleos com cauda 2 vezes o diâmetro do núcleo. Núcleos de células apoptóticas, que se apresentam totalmente fragmentados geralmente não são contabilizados (SPEIT *et al.*, 1996).

O ensaio cometa é muito usado para avaliar o reparo de diferentes tipos de danos de DNA. A versão neutra detecta danos na fita dupla de DNA e a versão

alcalina detecta danos na fita simples de DNA. Cerca de 50% dos danos são reparados dentro de 15 minutos e o reparo completo ocorre em 1 ou 2 horas (ROJAS, LOPEZ & VALVERDE, 1999).

Por sua simplicidade e relativo baixo custo, o teste do cometa é promissor para a avaliação de produtos químicos em larga escala. Além disso, o teste pode ser utilizado para distinguir entre os danos genotóxicos ou citotóxicos, *in vitro*, ou entre cancerígenos de ação genotóxica ou não genotóxica, *in vivo*. Além das vantagens citadas, o teste do cometa difere de outros ensaios que detectam danos no DNA por requerer células viáveis, mas não em divisão, permitindo, assim, a sua aplicação a qualquer tipo de tecido dos quais células vivas possam ser obtidas. Além disso, o fato do ensaio possibilitar o acesso às quebras do DNA de um única célula, poucas células (de 1 a 10.000) são suficientes para sua realização (TICE *et al.*, 2000).

Segundo Hartmann *et al.* (2003), uma desvantagem do ensaio cometa é que não é capaz de detectar aneuploidias. Além disso, assim como outros ensaios citogenéticos, sugere-se a comparação de resultados com outros testes clássicos citogenéticos.

Diversos trabalhos vêm demonstrando a eficácia do teste do cometa. Maistro *et al.* (2004) avaliaram o potencial genotóxico da *Casaria sylvestris* em HTC e células V79, testadas com 3 concentrações (0.5, 1 e 2 mg/ml) do extrato. Os resultados mostraram que o mesmo não apresentou nenhum efeito genotóxico e não modificou o efeito de indução de dano no DNA causados pela ciclofosfamida e pelo metilmetanosulfonato.

O flúor tem sido amplamente usado na Odontologia, pois é um agente profilático efetivo e específico contra a cárie dentária. Entretanto, o flúor em excesso pode representar perigos à saúde humana, especialmente por causar agressão ao

material genético. Testes de genotoxicidade constituem uma parte importante da pesquisa do câncer para a avaliação de risco de possíveis carcinógenos. Ribeiro *et al.* (2006) avaliaram os danos ao DNA associados à exposição ao flúor pelo teste de células individualizadas em gel de agarose (teste do cometa) *in vitro*. Células de linfoma murino e fibroblastos humanos foram expostas ao fluoreto de sódio (NaF) nas concentrações finais de 7 a 100 mg/mL durante 3 h a 37°C. Os resultados mostraram que o NaF não contribuiu para os danos ao DNA em ambos os tipos celulares estudados e em todas as concentrações testadas, conforme demonstrado pelas médias do momento da cauda e intensidade da cauda dos cometas. Estes achados são clinicamente importantes, uma vez que representam uma importante contribuição para a avaliação do risco potencial à saúde, associada à exposição a agentes geralmente empregados na prática odontológica.

A fluoxetina, com nome comercial Prozac, é eficaz contra a depressão e a ansiedade, com menor risco de causar efeitos colaterais. Contudo, os possíveis efeitos genotóxicos ainda são desconhecidos. A utilização de vitaminas, como protetoras de danos nas células e no DNA, têm sido avaliadas, principalmente para as vitaminas A e C, e, além disso, o efeito associativo das vitaminas com diversos medicamentos necessita de mais estudos. Lemos *et al.* (2005) avaliaram o efeito genotóxico do Prozac e o efeito protetor das vitaminas A e C realizadas em cultura de células de ovário de *hamster* chinês da linhagem CHO-K1, através do teste do cometa. Foi utilizado o Prozac em formulação líquida diluído em concentrações de 5mg, 1mg e 0,2mg/mL de meio de cultura. As vitaminas A e C, respectivamente, foram utilizadas na formulação líquida nas concentrações de 3mg e 880,5mg/mL de meio de cultura. Os tratamentos foram feitos durante 1h. Os dados obtidos demonstraram que somente a concentração mais alta de Prozac (5mg) foi

genotóxica, e tanto a vitamina A quanto a C reduziram essa genotoxicidade. Assim, sugeriu um monitoramento em pacientes que fazem uso do Prozac e a possibilidade de associação das vitaminas A e C para minimizar os efeitos genotóxicos.

O cogumelo shiitake (*Lentinula edodes*), consumido mundialmente em função de suas propriedades terapêuticas contra o câncer, foi estudado por Miyaji *et al.* (2001), em três concentrações distintas de um extrato aquoso, preparado a 22°C, em cultura de células de carcinoma epidermóide de laringe humana (HEp-2), utilizando-se o teste do Micronúcleo (MN). Os resultados com este teste indicam que o extrato de shiitake não se comportou, nas condições experimentais utilizadas, como um composto clastogênico nem aneugênico.

#### **4.3 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE FITOTERAPIA**

Desde tempos imemoriais, o homem, busca, na natureza, recursos que melhorem sua condição de vida para, assim aumentar suas chances de sobrevivência pela melhoria de sua saúde. Em todas as épocas e culturas, ele aprendeu a tirar proveito dos recursos naturais locais (BRASIL, 2006).

Até a primeira metade do século XX, o Brasil era essencialmente rural e usava amplamente a flora medicinal, tanto nativa quanto introduzida. Hoje, a medicina popular do país é reflexo das uniões étnicas entre os diferentes imigrantes e os inúmeros povos autóctones que difundiram o conhecimento das ervas locais e de seus usos, transmitidos e aprimorados de geração em geração (LORENZI & MATOS, 2002).

Fitoterapia é a terapêutica caracterizada pela utilização de plantas medicinais validadas e sua diferente forma farmacêutica, sem a utilização de substância ativa isolada, ainda que de origem vegetal (BRASIL, 2006).

O uso de fitoterápicos com finalidade profilática, curativa, paliativa ou com fins de diagnósticos passou a ser oficialmente reconhecido pela Organização Mundial de Saúde em 1978, quando recomendou a difusão mundial dos conhecimentos necessários para o seu uso. Considerando-se as plantas medicinais importantes instrumentos da Assistência Farmacêutica, vários comunicados e resoluções da Organização Mundial de Saúde expressam a posição do organismo a respeito da necessidade de valorizar o uso desses medicamentos no âmbito sanitário. É sabido que 80% da população mundial depende das práticas tradicionais no que se refere à atenção primária à saúde, 85% dessa parcela utiliza plantas ou preparações à base de vegetais. Ressalte-se aí que 67% das espécies vegetais medicinais do mundo são originadas dos países em desenvolvimento (ALONSO, 1998).

Segundo o Ministério da Saúde (2006), a prática da medicina tradicional expandiu-se globalmente na última década do século passado e ganharam popularidade. Essas práticas são incentivadas por profissionais que atuam na rede básica de saúde, como por aqueles que trabalham onde a medicina convencional é predominante no sistema de saúde local. Neste sentido, a Organização Mundial de Saúde tem elaborado uma série de resoluções com objetivo de considerar o valor potencial da medicina tradicional em seu conjunto para expansão dos serviços de saúde regional.

Há uma grande preocupação no que diz respeito à segurança no uso de extratos de plantas. Com a intenção de garantir a qualidade e segurança da fitomedicina, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) do Brasil, publicou



em 24 de fevereiro de 2000, a resolução nº 17, estabelecendo que os fitofármacos devem ser submetidos a ensaios toxicológicos pré-clínicos e clínicos (BRASIL, 2000).

Conforme Ferreira (1998), apesar da riqueza da flora brasileira e da ampla utilização de plantas medicinais pela população, existe em consenso na insuficiência de estudos científicos acerca do assunto. Portanto, torna-se necessário estimular a realização desses estudos, tendo em vista a importância dos seus resultados tanto individuais como sociais.

Possivelmente, problemas econômicos, inexistência de estudos organizados e integrados, aliados à ausência de uma política governamental para a exploração desse manancial de riquezas biológicas, como instrumento de acesso social, não permitiram, até o momento, a transposição de grande parcela das nossas espécies vegetais medicinais ao conceito de fitoterápico (BRASIL, 2006).

#### **4.4 CONSIDERAÇÕES GERAIS SOBRE *Musa paradisiaca***

*Musa paradisiaca* é uma planta pertencente à família Musáceas, popularmente conhecida como banana. É a cultura mais antiga e importante servindo para a alimentação de milhões de pessoas no mundo inteiro. Tanto a sua região de origem quanto a sua classificação botânica são assuntos para muita discussão. Contudo, há uma unanimidade de opiniões por sua origem na Ásia, onde é cultivada há mais de quatro mil anos (SILVA, 1997).

A banana chegou ao Ocidente trazida por comerciantes árabes, que a transportavam como valioso alimento para ser consumido durante as viagens de

suas caravanas; logo depois, começaram a plantá-las nas costas do Atlântico. Seu cultivo, porém, teve início em sua própria terra de origem: as úmidas selvas da Índia e a península da Indochina (ALVES, 1997).

Foram os árabes que lhe deram o nome pelo qual é conhecida em quase todos os idiomas: banana significa "dedo" em árabe. Foram também os árabes, como agricultores, na época em que ocupavam as Ilhas Canárias, que iniciaram as grandes plantações que fornecem a fruta para grande parte da Europa. Entretanto, essa planta bastante útil só conquistou o planeta quando o missionário Tomás de Berlanga, no início do século XVI, decidiu levar alguns rizomas das Canárias para o Novo Mundo. A partir de então, extensos bananais começaram a avançar sobre as selvas do Caribe e das regiões tropicais da América, dando origem a enormes fortunas e criando acirradas disputas entre os comerciais dessas "repúblicas das Bananas" (ALVES, 1997).

Atualmente, no Brasil, encontram-se bananas em qualquer parte, destacando-se as regiões Nordeste e Sudeste como as maiores produtoras nacionais da fruta, com 20 variedades comestíveis, sendo consumida em todo o país, o ano inteiro (BLEINROT, 2006).

#### **4.4.1 Cultura da Banana**

A bananeira, planta tipicamente tropical, exige calor constante, precipitações bem distribuídas e elevada umidade para o seu bom desenvolvimento e produção. O solo ideal para a bananeira é o aluvial profundo, rico em matéria orgânica, bem drenada e com boa capacidade de retenção de água. Os solos muito arenosos

devem ser evitados. A bananeira necessita de adubação abundante, não só porque retira grandes quantidades de nutrientes do solo, como também muitos solos onde é cultivada são ácidos e pobres em nutrientes. A adubação deve seguir a recomendação baseada na análise do solo. O nitrogênio é importante para o crescimento vegetativo da bananeira. Devem ser aplicados 30 a 45 dias após o plantio, na forma de uréia ou sulfato de amônio. O potássio é importante para produção de frutos de qualidade. Iniciar sua aplicação no terceiro ou quarto mês após o plantio. O adubo deve ser colocado em círculo na planta nova e em meia lua ao lado do filho na planta adulta, sempre numa faixa distante 40 cm da planta (CORDEIRO, 2000).

As cultivares mais difundidas no Brasil são: Prata, Pacovan, Prata Anã, Maçã, Mysore, Terra e D'Angola do grupo genômico AAB, Nanica, Nanicão e Grande Naine, do grupo AAA, utilizadas principalmente para exportação (CORDEIRO, 2000).

Propaga-se por rizoma, por não possuir sementes. Pode ser plantada em todo o território brasileiro durante a estação chuvosa, produzindo o ano todo. Cresce em áreas com muito sol e não suporta solos encharcados (MOREIRA, 1997).

#### **4.4.2 Nomenclatura da Banana**

Grande parte das cultivares de banana apresenta genomas de *Musa acuminata* e *M. balbisiana*, tornando-se praticamente impossível dizer qual a verdadeira espécie da banana cultivada. Para contornar este problema,

desenvolveu-se um sistema chamado de grupamento genômico, caracterizado pelas letras A e B, respectivamente, oriundas de *M. acuminata* e *M. balbisiana*. Assim, a banana deve ser referida como *Musa sp.*, seguida do "Grupo Genômico". Se em uma cultivar existem mutações interessantes, que venham constituir uma ou várias novas cultivares, para este conjunto semelhante de genótipos, usa-se o termo Subgrupo. Exemplos: Pacovan: *Musa sp.*, grupo genômico AAB e subgrupo Prata. Nanicão: *Musa sp.*, grupo genômico AAA e subgrupo Cavendish (ALVES, 1997).

Os recentes estudos genéticos vieram comprovar que os nomes acima representam híbridos e não espécies no senso biológico do termo. Todas as espécies comestíveis hoje conhecidas têm origem biespecífica, isto é, resultaram do cruzamento entre duas espécies selvagens, *M. acuminata* e *M. balbisiana*. Em razão disso, o nome científico correto de uma variedade qualquer de banana torna-se meio complicado (CORREA, 1998).

#### **4.4.3 Características**

A banana é, na verdade, o fruto de uma planta que pode ser descrita como uma "erva gigante". Esta é, aliás, uma das principais características de todas as *Musáceas*. Planta com caule suculento e subterrâneo, cujo "falso" tronco é formado pelas bases superpostas das folhas. Folhas grandes de coloração verde-clara e brilhantes (CORREA, 1997).

As flores da bananeira são exóticas, pequenas e envoltas por uma bráctea arroxeada, quando jovem, conhecida como "coração da planta". Seus frutos, que podem ser apanhados quando ainda completamente verdes, nascem em grandes

cachos, de aspecto e forma característicos, por uma única e abundante vez. Alongado, de casca mole, com a polpa carnosa de coloração amarelada, variável de acordo com a variedade (FIG. 1). Quando não maduras, as bananas são, em geral, de cor verde. Seu sabor é adstringente e intragável: diz-se que quando a banana está verde ela "*pega*" na boca. Isto porque, antes de sua maturação, as bananas se compõem, basicamente, de amido e água. Tanto é assim que, com a maioria das bananas verdes, pode-se produzir uma farinha extremamente nutritiva, que tem inúmeras aplicações na alimentação, desde o preparo de mingaus até biscoitos. Em seu processo de amadurecimento, a maior parte desse amido contido nas bananas transforma-se em açúcar, glicose e sacarose. E é por isso que, de maneira geral, a banana é uma das frutas mais doces entre todas as frutas. Bananas existem muitas; as comestíveis são agrupadas em variedades de acordo com a consistência e a coloração da casca e da polpa. Mas, para cada função ou uso, uma é melhor do que a outra, respeitando-se as preferências regionais e pessoais (ALVES, 1997).

Também é a mais popular de todas as frutas, sendo consumida no mundo inteiro. Rica em açúcares e vitamina C, foi chamada "o alimento dos sábios". Suas virtudes nutritivas e terapêuticas são inúmeras. A banana também favorece a secreção dos neurotransmissores (SCHNEIDER, 1984).

Além de ser uma das frutas mais saborosas, é também um alimento dos mais completos.

Na sua polpa são produzidos neurotransmissores, como a dopamina e a tirosina. A primeira dessas substâncias rege a coordenação motora por meio do sistema nervoso; a segunda intervém na formação de novos neurotransmissores, sobretudo da adrenalina e da noradrenalina. Estes, por sua vez, influem de forma decisiva sobre o nível da lucidez (VALOIS, 2006).

A banana é um excelente alimento para os esportistas. Isto se deve ao fato de essa fonte natural de energia (ao contrário do açúcar refinado, outra contribuição dos árabes para a dieta ocidental) conter, em proporções quase ideais, diversos carboidratos cuja combinação tem a propriedade de produzir gradualmente seus efeitos benéficos. Primeiramente, a glicose passa quase que imediatamente à corrente sanguínea para, em seguida, ser queimada. Por sua vez, a frutose só se decompõe duas horas após a ingestão. E, por último, o amido é absorvido pelo organismo de forma mais lenta, o que explica a sensação de saciedade prolongada que a banana produz. Por outro lado, trata-se de um alimento de baixa caloria: cem gramas desta fruta contêm somente 96 calorias. Sua porcentagem de gordura não ultrapassa 0,2% (a carne bovina tem 2,87%) (SCHNEIDER, 1984).

A banana não contém somente uma grande porcentagem de vitamina E, o seu componente mais conhecido. A presença da vitamina C também é elevada. Destaca-se, ainda, por conter vitaminas energéticas e as vitaminas do grupo B, cujo consumo é importante, principalmente para o sistema nervoso. Junto com elas, atua o ácido fólico, substância vital para o metabolismo e a formação de glóbulos vermelhos. Além disso, o ácido fólico serve de agente protetor contra o câncer uterino (VALOIS, 2006).

A banana, além de oferecer uma considerável cota de energia e vitaminas, também é rica em minerais (ferro, cobre, flúor, cálcio, fósforo), úteis para complementar as monótonas dietas compostas praticamente de proteínas e carboidratos. Seu equilíbrio energético, vitamínico e mineral permite recomendar seu consumo imediatamente após a realização de qualquer esforço físico intenso. O potássio, elemento abundante na banana, cumpre o papel de manter o

equilíbrio hidroelétrico do organismo. Além disso, fixa os ácidos estomacais e atua como protetor contra o estresse do estômago. O magnésio, também presente em elevadas porcentagens, é parte essencial da molécula de diversos reguladores metabólicos, mais conhecidos como enzimas (SCHENEIDER, 1984).



FIGURA 1 – *Musa paradisiaca L*

#### 4.4.4 Estudos científicos utilizando a Casca da Banana

Medeiros *et al.* (2003) realizaram um estudo do aproveitamento da casca de banana na produção de farinha básica, como fonte suplementar de proteína. A farinha foi obtida por desidratação da casca de banana e posterior moagem em moinho de martelo. Na determinação de umidade, cinzas, proteínas, lipídios, açúcares totais e amido, foram utilizadas as metodologias das Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Na determinação dos elementos minerais, utilizou-se, para as análises de Potássio (K) e Sódio (Na), a Fotometria de Chama, e, para as análises de Fósforo (P), utilizou-se a Colorimetria, segundo Normas Analíticas do Instituto Adolfo Lutz (1985). Na análise de Cálcio (Ca), Magnésio

(Mg), Cobre (Cu) e Ferro (Fe), utilizou-se a Espectrometria de Absorção Atômica. A farinha de casca de banana apresentou teores de amido, açúcares totais, umidade, cinzas, lipídios e proteínas de: 35; 31,65; 13; 10; 8,80 e 8,30% respectivamente. Os teores de K, Na e Fe, considerados elevados, foram de: 55,7; 67,4 e 69,4 mg/Kg, respectivamente. Esses teores, quando comparados aos da polpa de banana, são competitivos, pois a casca apresentou teores elevados de material organomineral, amido e carboidratos, conferindo, dessa forma, ao alimento, altos valores energéticos e nutritivos.

No sul da Índia, a banana verde é usada para tratamento de pacientes com úlcera péptica, sendo prescrita sob a forma de farinha (DADOO, KHATRI & SINGLA, 1995). Em trabalho realizado por Best *et al.* (1984), várias preparações de banana verde, utilizadas em úlceras induzidas por aspirina em ratos, demonstraram serem efetivas tanto no tratamento profilático quanto curativo.

O extrato de banana verde não só aumenta a densidade da mucosa, como também a incorporação de timidina ao DNA das células, demonstrando seu efeito sobre a multiplicação celular. O estudo histológico mostrou que o tratamento aumentava a proliferação das células apicais e das camadas mais profundas da mucosa, sugerindo não só o aumento da resistência contra substâncias capazes de provocar úlceras, como também de promover a cura pela indução da proliferação celular (GOEI *et al.*, 1986). O componente ativo encontrado na casca de bananas verdes foi extraído e identificado como um flavonóide leucocianidina.

Os trabalhos citados acima demonstraram a existência de substâncias cicatrizantes na banana verde, confirmando cientificamente, a utilização na medicina popular da casca de banana no tratamento de fissuras.



Boniolo (2007) provou que o pó da casca de banana pode remover metais pesados da água, uma solução para problemas tão graves como o tratamento de resíduos tóxicos.

Novak *et al.* (2003), com o objetivo de estudar a microbiota da casca de banana prata, comercializada na cidade do Rio de Janeiro, tentando correlacioná-la com a possibilidade de que seja uma fonte de infecção para a mulher que a utiliza como terapia para fissuras mamilares, estudaram 20 amostras de casca de banana. As análises microbiológicas revelaram a ocorrência de diversos grupos clássicos de microrganismos. A distribuição percentual dos resultados positivos nas amostras de casca de banana, em função das contagens, foram: mesófilos, 100%; coliformes totais, 20%; estafilococos coagulase-positiva, 25%; bolores e leveduras, 30% proteolíticos, 70%; lipolíticos, 30% e bactérias lácticas, 95%. Coliformes fecais e *Pseudomonas aeruginosa* não foram isolados. A avaliação conjunta dos resultados revela a presença de microrganismos potencialmente patogênicos em níveis capazes de comprometer a qualidade microbiológica da casca de banana. A sua aplicação sobre fissuras mamilares para o tratamento destas pode favorecer o início de um processo infeccioso.

## 5 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 MATERIAL

#### 5.1.1 Material vegetal e obtenção do extrato da *Musa paradisiaca*

O extrato etanólico a 70% de cascas maduras dos frutos de *Musa paradisiaca* foi obtido no Laboratório de Farmacognosia, Departamento de Ciências Farmacêuticas, USP, Ribeirão Preto, SP, Brasil.

#### 5.1.2 Animais utilizados no estudo

Os animais utilizados no experimento para avaliação do potencial genotóxico foram camundongos *Swiss (Mus musculus)* com doze semanas de vida, pesando aproximadamente 25 a 30g, provenientes do Biotério Central da Universidade José do Rosário Vellano (UNIFENAS), Alfenas-MG., tratados com ração comercial Labina-Purina e água *ad libitum*, garantida a sua adaptação em sala climatizada a  $23 \pm 2$  °C, com ciclo claro-escuro de 12h, e em caixas de polipropileno adequadas à sua manutenção. Em todos os experimentos realizados, o número de camundongos por grupo foi igual a 6 (n=6). Ao término do experimento, todos os animais foram submetidos à eutanásia por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas.

## 5.2 MÉTODOS

### 5.2.1 Avaliação de genotoxicidade

#### 5.2.1.1 Os grupos experimentais

Os experimentos foram desenvolvidos em 5 grupos de camundongos, com 6 animais em cada grupo, 3 fêmeas e 3 machos. Foram testadas 3 doses do extrato de *Musa paradisiaca* 1000, 1500 e 2000 mg/Kg de peso corporal. Os grupos de animais foram tratados conforme descrito a seguir:

1. Grupo 1 (Controle positivo): aos camundongos foram administrados intraperitonealmente 50mg/kg de peso corporal, da droga EtlI-nitroso-ureia (ENU). Foram coletados 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga. Os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após o tratamento.

2. Grupo 2 (Controle negativo): os camundongos foram tratados com 0.5 ml de água destilada, via oral. Foram coletados 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da água. Os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após o tratamento.

3. Grupo 3 (Tratamento 1): os camundongos foram tratados com 0.5 ml de solução com o extrato de *Musa paradisiaca* na concentração de 1000 mg/kg de peso corporal, via oral. Foram coletados 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga. Os animais foram

sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após o tratamento.

4. Grupo 4 (Tratamento 2): os camundongos foram tratados com 0.5 ml de solução com o extrato de *Musa paradisiaca* na concentração de 1500 mg/kg de peso corporal, via oral. Foram coletados 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga. Os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após o tratamento.

5. Grupo 5 (Tratamento 3): os camundongos foram tratados com 0.5 ml de solução com o extrato de *Musa paradisiaca* na concentração de 2000 mg/kg de peso corporal, via oral. Foram coletados 10 microlitros de sangue periférico da veia orbital nos tempos de 24h, 48h e 72h após a aplicação da droga. Os animais foram sacrificados por inalação de dióxido de carbono em câmaras de acrílico adaptadas 72 horas após o tratamento.

### **5.2.2 Protocolo para aplicação do ensaio do cometa (SCGE) para detecção de danos de DNA em células de eucariotos**

O ensaio cometa combina a simplicidade das técnicas bioquímicas para detecção de quebras de fita simples de DNA e/ou sítios álcali-lábeis com as abordagens típicas dos ensaios citogenéticos em células.

A obtenção das lâminas com as células corridas em gel de eletroforese para a avaliação de danos ao DNA foi desenvolvida de acordo com a técnica descrita por Singh *et al.* (1988) e Klaude *et al.* (1996), com modificações, e consiste em:

### 5.2.2.1 Preparo das soluções

#### Solução de lise-uso (100ml)

Foram adicionados 1mL de Triton X-100, 10mL de DMSO e 89 mL da solução de lise estoque, e então refrigerada (4 °C) durante 60 minutos antes da adição das lâminas.

#### Tampão de neutralização

Foi adicionado o Tris em 950mL de dH<sub>2</sub>O, ajustado o PH em 7,5 com HCL concentrado (aproximadamente 30mL) e estocado em temperatura ambiente.

#### Solução de coloração

Brometo de etídeo (10x estoque: 200 µg/mL) 10 mg em 50 mL de H<sub>2</sub>O. Estocado em temperatura ambiente. Solução de uso: 1 mL de brometo de etídeo em 9 mL de H<sub>2</sub>O.

### 5.2.2.2 Preparo de células

Foram utilizados cerca de 10 µL de células de sangue periférico de cada camundongo swiss albino, obtidos a partir da veia orbital por intermédio de microcapilar heparinizado e misturados com 120 µL de agarose LMP, então adicionados na lâmina.

### 5.2.2.3 Preparo das lâminas

1. As lâminas foram limpas com etanol antes do uso.
2. Preparada a agarose normal 1,5% (300mg em 20mL PBS) e fervida 2-3 vezes antes do uso. As lâminas limpas foram mergulhadas na agarose quente ( $>60^{\circ}\text{C}$ ); sendo retirada a agarose de um lado das lâminas com papel e colocada em posição horizontal para secar de um dia para o outro em temperatura ambiente (procedimento rápido). Essas lâminas podem ser estocadas e usadas por várias semanas.
3. Preparada a agarose LMP 0,5% (100mg em 20mL PBS). Aquecida em microondas e colocada em banho-maria a  $37^{\circ}\text{C}$  para uso.
4. Em um *eppendorf* adicionado  $120\mu\text{L}$  de agarose LMP ( $37^{\circ}\text{C}$ ) com 5 a  $15\mu\text{L}$  de suspensão celular. Coberto com lamínula e condicionado em refrigerador durante 10-20 minutos. Após a adição das células na lâmina, evitou-se exposição à luz direta (irradiação) para prevenção de danos adicionais no DNA.
5. As lamínulas foram removidas gentilmente e as lâminas depositadas na solução de lise e levadas ao refrigerador ( $4^{\circ}\text{C}$ ) durante 1 hora. As lâminas podem ser estocadas durante períodos longos na solução de lise gelada (mas geralmente não mais do que 4 semanas). Após precipitação da solução de lise as lâminas foram lavadas gentilmente em PBS antes da eletroforese.

### 5.2.2.4 Eletroforese e coloração

1. Após o tempo da lise, as lâminas foram removidas gentilmente, e depositadas na cuba horizontal de eletroforese preenchendo o máximo possível dos espaços (completado com lâminas limpas, quando necessário).
2. Adicionado o tampão, pH13, de eletroforese gentilmente, até que as lâminas ficassem cobertas. A cuba foi depositada em um recipiente com gelo (4°C).
3. As lâminas foram deixadas imersas no tampão dentro da cuba por 20 minutos para desnaturação do DNA.
4. A seguir, Iniciada a corrida de eletroforese com 25 volts e 300 miliamperes, os parâmetros foram acertados removendo ou adicionando tampão. A corrida de eletroforese ocorreu durante 20 minutos.
5. Após eletroforese, retiradas as lâminas gentilmente, e depositados sobre as mesmas, cerca de 5mL de solução de neutralização, deixado durante 5 minutos. Repetido mais duas vezes este procedimento.
6. As lâminas foram secas na posição inclinadas em temperatura ambiente e fixadas com etanol durante 5 minutos. Depois de secas, foram armazenadas em caixas na geladeira para posterior análise.
7. Quando da leitura das lâminas, depositados, sobre as mesmas, 30 $\mu$ L de solução de brometo de etídeo, preparada a partir de uma solução estoque de 20mg/ml, cobertas com lamínula, procedendo-se em seguida às análises.

#### 5.2.2.5 Avaliação dos danos ao DNA

Para visualização dos danos no DNA, as lâminas foram observadas em aumento de 400x usando microscópio de fluorescência equipado com filtro de excitação de 515-560 nm e um filtro de barreira de 590 nm. Analisaram-se 100 células de cada animal.

1 Estas células foram visualmente classificadas de acordo com o tamanho da cauda em quatro classes (de não danificada, 0, até dano máximo, 4), Iniciado com 4 classes (0 - sem dano; 1 - dano pequeno; 2 - dano médio; e 3 - dano máximo). Após a leitura realizou-se o escore de cada tratamento multiplicando-se o número de núcleos observados em cada classe pelo valor da classe, somando-se os resultados e obtendo-se o escore de cada tratamento.

### **5.2.3 Protocolo para o teste do micronúcleo**

A técnica utilizada para a obtenção das células de sangue periférico para a investigação de ocorrência de micronúcleos foi a de Schmid (1976), modificada por Zambrano *et al.* (1982), adaptada no laboratório de Genética da UNIFENAS para análise de sangue periférico:

1. Administrada a substância a ser testada por via oral e/ou intraperitoneal.
2. Coletados cerca de 10 $\mu$ L de sangue periférico a partir da veia orbital dos camundongos (as coletas foram feitas 48 e 72 horas após o tratamento com a substância em avaliação). Após a última coleta (72 horas), submetido o animal a eutanásia em câmara de gás de CO<sub>2</sub>.
3. Transferidas as gotas de sangue para uma lâmina de microscopia e feito o esfregaço.
4. Deixadas às lâminas secarem no ar.
5. No dia seguinte, fixadas em álcool 70% durante 10 minutos e deixadas secar bem.
6. As lâminas foram coradas com Giemsa diluído 1:10 em tampão fosfato pH 6,8 durante 15 min.



7. Lavadas em água destilada e depois de secas, armazenadas em caixas apropriadas para posterior análise.

8. Quando da análise das lâminas, foram observadas em microscópio óptico em objetiva de imersão.

Foram analisados 4000 eritrócitos policromáticos para cada animal (2000 células para amostra de sangue de 48h e 2000 células para amostra de sangue de 72h).

Para cada animal foram analisadas 1000 células para determinar a relação de eritrócitos policromáticos/normocromáticos.

### **5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados obtidos no teste do micronúcleo e no ensaio cometa foram submetidos à análise estatística de variância One-way (ANOVA) e ao teste de Tukey Kramer (SOKAL & ROHLF, 1995), usando o software GraphPad InStat® (versão 3.01). Os resultados foram considerados estatisticamente significantes para  $p < 0.05$ .

### **5.4 ASPECTO ÉTICO**

O presente trabalho foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade José do Rosário Vellano, com o protocolo 13 A / 2006 (ANEXO A).

## 6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O *single cell gel electrophoresis* (SCGE) ou Ensaio Cometa em meio alcalino é um método rápido e sensível para detectar quantitativamente lesões no DNA em células de mamíferos (SASAKI *et al.*, 1997). Neste teste, fragmentos de DNA que sofreram quebras migram e se distanciam do núcleo principal do DNA intacto; então, a extensão dos danos ao DNA pode ser mensurada pelo comprimento deste fluxo. Além disso, as lesões no DNA podem ser medidas mesmo na ausência de atividade mitótica.

TABELA 1  
Migração do DNA no teste do cometa para avaliar a genotoxicidade do extrato de *Musa paradisiaca* em leucócitos de sangue periférico (coletados 24 h após o tratamento) em camundongos Swiss fêmeas (F) e machos (M) *in vivo*.

Tratamentos	Animais	Total <sup>1</sup>	Classes do cometa				Escores
			0	1	2	3	
Controle	F <sub>1</sub>	3	97	3	0	0	3
	F <sub>2</sub>	3	97	3	0	0	3
	F <sub>3</sub>	1	99	1	0	0	1
	M <sub>1</sub>	5	95	5	0	0	5
	M <sub>2</sub>	2	98	2	0	0	2
	M <sub>3</sub>	4	96	4	0	0	4
		<b>3.0 ± 1.41</b>	<b>97.0 ± 1.41</b>	<b>3.0 ± 1.41</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>3.0 ± 1.41</b>
<i>M. paradisiaca</i> (1.000 mg/Kg)	F <sub>1</sub>	6	94	6	0	0	6
	F <sub>2</sub>	8	92	8	0	0	8
	F <sub>3</sub>	5	95	5	0	0	5
	M <sub>1</sub>	9	91	9	0	0	9
	M <sub>2</sub>	9	91	9	0	0	9
	M <sub>3</sub>	4	96	4	0	0	4
		<b>6.83 ± 2.13</b>	<b>93.1 ± 2.13</b>	<b>6.83 ± 2.13</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>6.83 ± 2.13</b>
<i>M. paradisiaca</i> (1.500 mg/Kg)	F <sub>1</sub>	19	81	10	6	3	31
	F <sub>2</sub>	20	80	10	5	5	35
	F <sub>3</sub>	12	88	7	3	2	19
	M <sub>1</sub>	14	86	7	7	0	21
	M <sub>2</sub>	16	84	7	5	4	29
	M <sub>3</sub>	32	68	21	10	1	44
		<b>18.8*** ± 7.11</b>	<b>81.1*** ± 7.11</b>	<b>10.3* ± 5.42</b>	<b>6.0* ± 2.36</b>	<b>2.5 ± 1.87</b>	<b>29.8** ± 9.2</b>
<i>M. paradisiaca</i> (2.000 mg/Kg)	F <sub>1</sub>	35	65	22	8	5	53
	F <sub>2</sub>	20	80	17	1	2	25
	F <sub>3</sub>	35	65	11	13	11	70
	M <sub>1</sub>	26	74	14	5	7	65
	M <sub>2</sub>	32	68	19	10	3	48
	M <sub>3</sub>	25	75	13	5	7	64
		<b>28.8*** ± 6.11</b>	<b>71.1*** ± 6.11</b>	<b>16.0*** ± 4.09</b>	<b>7.0* ± 4.24</b>	<b>5.8 ± 3.25</b>	<b>54.1*** ± 16.4</b>
Etil-nitrso-uréia (50 mg/Kg)	F <sub>1</sub>	93	7	14	25	54	226
	F <sub>2</sub>	79	21	18	23	38	178
	F <sub>3</sub>	80	20	8	37	35	187
	M <sub>1</sub>	82	18	11	31	40	193
	M <sub>2</sub>	81	19	19	33	29	172
	M <sub>3</sub>	83	17	11	31	41	196
	<b>Mean ± SD</b>	<b>83.0*** ± 5.09</b>	<b>17.0*** ± 5.09</b>	<b>13.5*** ± 4.32</b>	<b>30.0*** ± 5.1</b>	<b>39.5*** ± 8.3</b>	<b>192*** ± 18.9</b>

\* Significativamente diferente do controle negativo (P < 0.05).

\*\* Significativamente diferente do controle negativo (P < 0.01).

\*\*\* Significativamente diferente do controle negativo (P < 0.001).

<sup>1</sup>Número total de células com danos (classe 1+2+3).

A TAB. 1 mostra os dados de migração do DNA (ensaio cometa) dos leucócitos de sangue periférico de camundongos Swiss albinos coletados 24 horas

após o tratamento dos animais com diferentes concentrações do extrato de *Musa paradisiaca*.

Como esperado, a droga Etil-nitroso-ureia (ENU), usada como controle positivo, levou à fragmentação e posterior migração do DNA dos leucócitos de sangue periférico no SCGE. Efeitos estatisticamente significativos na migração de DNA foram encontrados nas duas maiores concentrações testadas do extrato de *Musa paradisiaca*. A dose de 1000 mg/kg do extrato produziu alguns danos de DNA nas células, enquadrados na classe 1, porém, estes danos não foram estatisticamente significativos em relação ao controle negativo. Quando as células foram expostas ao extrato teste, a maioria delas não sofreu danos (classe 0), poucas células apresentaram um pequeno dano (classe 1) e muito poucas apresentaram um grande dano (classes 2 e 3). Observou-se também que houve uma diferença significativa na migração de DNA, entre as 3 diferentes concentrações do extrato testadas, onde as doses maiores do mesmo provocaram um maior dano ao DNA (TAB. 1).

Para se ter um parâmetro de comparação com os dados obtidos no SCGE, também foi aplicado, neste trabalho, o teste do micronúcleo. As características mais importantes desse teste são a rapidez e a facilidade pela qual a atividade genética pode ser demonstrada *in vivo* e o conhecimento de que, esses eventos, sendo de natureza cromossômica, são muito significativos em termos de riscos para os seres humanos (SALOMONE *et al.*, 1980; MAVOURNIN *et al.*, 1990).

TABELA 2

Número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MNPCE) observado em células de sangue periférico de camundongos Swiss em fêmeas (F) e machos (M) tratados com extrato *Musa paradisiaca* e respectivo grupo controle. Para cada tempo de amostra (48 e 72 h), 2000 células foram analisadas. SDM = desvio padrão da média.

Tratamentos	Tempo coleta sangue	Número de MNPCE por animal						Mean INPCE $\pm$ SDM	PCE/NCE Mean $\pm$ SDM
		F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>		
<b>Controle negativo (água)</b>	48 h	3	2	5	3	2	3	3.0 $\pm$ 1.09	2.62 $\pm$ 0.59
	72 h	3	4	1	3	3	6	3.33 $\pm$ 1.63	2.07 $\pm$ 0.24
<b><i>Musa paradisiaca</i> (1000 mg/kg)</b>	48 h	6	9	7	4	8	8	7.0*** $\pm$ 1.78	2.10 $\pm$ 0.50
	72 h	6	8	7	6	4	6	6.16* $\pm$ 1.32	1.97 $\pm$ 0.46
<b><i>Musa paradisiaca</i> (1500 mg/kg)</b>	48 h	11	7	8	7	7	9	8.16*** $\pm$ 1.60	3.17 $\pm$ 0.90
	72 h	6	7	7	7	9	6	7.0** $\pm$ 1.09	2.27 $\pm$ 1.03
<b><i>Musa paradisiaca</i> (2000 mg/kg)</b>	48 h	7	10	8	8	6	7	7.66*** $\pm$ 1.36	1.62 $\pm$ 0.17
	72 h	9	9	7	8	7	11	8.5*** $\pm$ 1.51	2.40 $\pm$ 0.62
<b>Controle positivo Etil-nitroso-ureia (50 mg/kg)</b>	48 h	12	15	10	12	12	11	12.0*** $\pm$ 1.67	1.98 $\pm$ 0.78
	72 h	11	9	12	10	11	12	10.83*** $\pm$ 1.16	1.93 $\pm$ 0.41

\* Significativamente diferente do controle negativo (P < 0.05).

\*\* Significativamente diferente do controle negativo (P < 0.01).

\*\*\* Significativamente diferente do controle negativo (P < 0.001).

A TAB. 2 mostra os resultados do teste do micronúcleo em células de camundongos Swiss (fêmeas e machos), após o tratamento com extrato de *Musa paradisiaca*: o número de micronúcleos em eritrócitos policromáticos (MNPCE) para cada animal, e a média dos grupos controle e tratados. Os resultados obtidos demonstraram aumento estatisticamente significativo do número de eritrócitos policromáticos micronucleados nas três doses testadas do extrato da planta. Esta tabela também apresenta a razão entre a quantidade de eritrócitos policromáticos (PCE) e eritrócitos normocromáticos (NCE) em 1000 células analisadas aleatoriamente para cada animal. O aumento do número de MNPCE não se mostrou associado à citotoxicidade em face de a razão entre eritrócitos policromáticos e

normocromáticos não ter sido diminuída significativamente em nenhuma das doses testadas.

A caracterização fitoquímica de extratos de *Musa paradisiaca* tem mostrado a presença de diversos polissacarídeos. A haste do rizoma de *Musa paradisiaca* apresenta pelo menos quatro diferentes frações polissacarídicas. A análise do consistente gel obtido da mesma indicou a presença de cerca de 1,5% de polifenóis e cerca de 10% de polissacarídeos (D-Glc, L-Ara, D-Xyl, D-Glucan), sendo o restante do material composto de água (cerca de 88,5%) em associação com minerais potássio, sílica, ligninas e pigmentos polifenólicos (ANJANEYALU *et al.*, 1997). O extrato metanólico de frutos contém diarilheptanoide, 1,2-di-hidro-1,2,3-trihidroxi-9-(4-metoxifenil)fenaleno, hidroxianigorufano, 2-(4-hidroxifenil)naftalico anidro e 1,7-bis(4-hidroxifenil)-hepta-e(E),6(E)-dien-3-ona (JANG *et al.*, 2002). O exudato mucilaginoso do caule contém ácido urônico, açúcares neutros, proteínas, ramnose, arabinose, xilose, manose, galactose, glicose, ao lado de outros açúcares específicos (MONDAL *et al.*, 2001). A concentração de traços de elementos das cascas da fruta e do tronco foram descritas por Selema e Farago (1996); contudo, não existem dados sobre os principais constituintes do extrato de cascas da fruta de *Musa paradisiaca* na literatura.

Muitos estudos têm demonstrado resultados com ação mutagênica positiva de extratos de plantas (SÁNCHEZ-LAMAR *et al.*, 2002; ZANONI *et al.*, 2005). Tais estudos, assim como o que foi desenvolvido neste trabalho, indicam a importância de se avaliar cientificamente a segurança de produtos utilizados na medicina popular, com especial atenção aos derivados de plantas. O efeito mutagênico do extrato de cascas dos frutos de *Musa paradisiaca* em células de sangue periférico de camundongos Swiss foi investigado pela primeira vez neste trabalho. Os

resultados indicaram que esse extrato bruto apresentou efeitos mutagênicos em células sanguíneas. Como o extrato de cascas de frutas de *Musa paradisiaca* está incluído como um produto de uso comum dentro da medicina folclórica, é aconselhável que seu uso seja moderado, sendo necessário o desenvolvimento de outros ensaios de mutagenicidade para finalmente estabelecer o seu risco para a saúde dos seres humanos.

## 7 CONCLUSÃO

- O teste do Micronúcleo indicou que o extrato de cascas de *Musa paradisiaca* apresentou efeitos aneugênicos clastogênicos sobre os eritrócitos policromáticos de sangue periférico dos camundongos *Swiss* albinos.
- Sob as condições do teste do Cometa, os resultados indicaram que o extrato de casca de *Musa paradisiaca* induziu aumento significativo de danos ao DNA nas duas maiores concentrações testadas em leucócitos de sangue periférico de camundongo *Swiss*, após ensaio *in vivo*.



## REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. *et al.* **Fundamentos da Biologia Celular**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2006. 866p.

ALONSO, R. J. **Tratado de fitomedicina: bases clínicas y farmacológicas**. Buenos Aires: ISIS, 1998. 1039 p.

ALVES, E. J. **A cultura da banana: aspectos técnicos, socioeconômicos e agroindustriais**. Brasília: Embrapa-SPI/Cruz das Almas, 1997. p.585.

ANJANEYALU, Y. V.; JAGADISH, R. L.; RAJU, T. S. Polysaccharide components from the scape of *Musa paradisiaca*: main structural features of water-soluble polysaccharide component. **Glycoconjugate Journal**, New York, v.14, p.507-512, 1997.

BARBISAN, L. F. *et al.* Influence of aqueous extract of *Agaricus blazei* on rat liver toxicity induced by different doses of diethylnitrosamine. **Journal of Ethnopharmacology**, New York, v.83, p.25-32, 2002.

BEST, R.; LEWIS, D. A.; NASSER, N. The anti-ulcerogenic activity of the unripe plantain banana (*Musa species*). **Br. J. Pharmacol.**, Londres, v.82, p.107-116, 1984.

BLEINROT, E. M. W: **Instituto de tecnologia de alimentos: banana-cultura, matéria prima, processamento e aspectos econômicos**. 2. ed. Campinas: ITAL, 2006. p.133-196.

BONIOLO, M. R. **Uso da casca de banana para o tratamento de efluentes radiotóxicos**. Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares – IPEN – São Paulo. 2007. Disponível em: <<http://cienciahoje.uol.com.br/67539>>. Acesso em: 03 jul. 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Ciência, Tecnologia Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A Fitoterapia no SUS e o Programa de Plantas Medicinais da Central de Medicamentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.40p.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos. **Diário Oficial da União**, Brasília, n. 17, de 25 de fevereiro de 2000.

BROWN, T. A. **Genética**: um enfoque molecular. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan, 1999. p.336.

BUCKER, A.; CARVALHO, W.; ALVES-GOMES, J. A. Avaliação de mutagenicidade and getotoxicity in *Eigenmannia virescens* (Teleostei: Gymnotiformes) exposed to benzene. **Acta Amazônica**, Manaus, v.36, n.3, p.357-364, jul./set. 2006.

BURNS, G. W.; BOTTINO, P. J. **Genética**. 6. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1991. 381 p.

COOK, P. R.; BRAZELL, I. A. Conformational constraints in nuclear DNA. **J. Cell Sci.**, England, v. 22, p.287-302, 1976.

CORDEIRO, Z. J. M. **Banana produção**: aspectos técnicos. Brasília: Embrapa Comunicação para Transferência de Tecnologia, 2000. p.143.

CORRÊA, A. D. **Plantas medicinais**: do cultivo à terapêutica. Petrópolis: Vozes, 1998. p. 80-106.

DADOO, R. C.; KHATRI, H. L.; SINGLA, S. Comparative evaluation of gastric secretory response to banana and porridge. **Indian. J Med. Sci.**, Mumbai, v.49, p.5-8, dez. 1995.

DELMANTO, R. D. *et al.* Avaliação do efeito protetor de chás de cogumelo *Agaricus blazei* Murill contra a genotoxicidade da ciclofosfamida e do n-etil-n-nitrosuréia. **Genetics and Molecular Biology**, Uberlândia, v.23, p.697, fev. 2000. Suppl.

ESPÓSITO, A. V. *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of the *Hypericum brasiliense* (Guttiferae) extract in mammalian cell system in vivo. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.28, n.1, p.152–155, jan./mar. 2005.

FERRARO, M. V. *et al.* Mutagenic effects of tributylun and inorganic lead (Pb II) on the fish *H. malabaricus* as evaluated using the comet assay and the piscine micronucleus and chromosome aberration test. **Genetics and Molecular Biology**, São Paulo, v.27, n.1, p.103-107, set. 2003.

FERREIRA, S. H. **Medicamentos a partir de plantas medicinais no Brasil**. Rio de Janeiro: Academia Brasileira de Ciências, 1998. 131 p.

FERREIRA, L.; CARVALHO, J. C. T.; MAISTRO, E. L. Standardized *solanum melongena* extract presents protective effects against chromosomal aberrations induced by doxorubicin in wistar rat bone marrow cells. **Cytologia**, Tokyo, v.68, n.2, p.177-181, 2003.

GOEL, R. K. *et al.* Anti-ulcerogenic effect of banana powder (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*) and its effect on mucosal resistance. **J Ethnopharmacol**, Londres, v.18, p.33-34, 1986.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à genética**. 7. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2002. 794 p.

HARTMANN, A. *et al.* Does physical activity induced DNA damage? **Mutagenesis**, New York, v.9, p.269-272, 2001.

HARTMANN, A. *et al.* Comparative study with alkaline Comet assay and the chromosome aberration test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.536, p.27-38, 2003.

HAYASHI, M. *et al.* The micronucleus assay using peripheral blood reticulocytes from mitomycin C- and cyclophosphamide-treated rats. **Mutation Research**, Tokyo, v.278, n.3, p.209-213, fev./mar. 1991.

HEDDLE, J. A. A. Rapid *in vivo* test for chromosome damage. **Mutation Research**, Amsterdam, v.18, p.187-192, 1973.

HEDDLE, J. A.; CARRANO, A. V. The DNA content of micronuclei induced in bone-marrow by gamma-radiation: evidence that micronuclei arise from acentric chromosome fragments. **Mutation Research**, Tokyo, v. 44, p. 63-69, 1997.

JANG, D. S. *et al.* Constituents of *Musa paradisiaca* cultivar with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase. **J Agric Food Chem**, v.50, n.22, p.6330-6334, 2002.

JONES, K. C.; GAUDIN, A. J. **Introdução à Biologia**. 3. ed. Lisboa: Fundação Calouste Gulbenkian Lisboa, 2006. p.865.

KAVALCO, K. **Alterações cromossômicas e mutações gênicas**. 1999. Disponível em: <[http://www.biociencia.org/index.php?option=com\\_content&task8&Itemid=71](http://www.biociencia.org/index.php?option=com_content&task8&Itemid=71)>. Acesso em: 24 jun. 2007.

KLAUDE, M. *et al.* The comet assay: mechanisms and technical considerations. **Mutation Research**, Amsterdam, v.363, p.89-96, 1996.

KOBAYASHI, H. *et al.* A comparison between manual microscopic analysis and computerized image analysis in the single cell gel electrophoresis assay. **MMS Commun.**, v.3, n.2, p.103-115, jun. 1995.

LEMOS, N. G.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Evaluation of genotoxic effect of prozac (fluoxetine) without and with addition of vitamins A and C by means of the comet assay in culture of CHO-K1 cells. **Semina Cienc. Biol. Saude**, Londrina, v.26, n.2, p.95-100, out./dez. 2005.

LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas cultivadas**. São Paulo: Instituto Plantarum, 2002. p. 158-159.

LU, Y. *et al.* DNA damaging effects of carbofuran and its main metabolites on mice by micronucleus test and single cell gel electrophoresis. **Sci. China C. Life Sci.**, Japan, v. 48, n.1, p.40-47, maio 2005.

MAISTRO, E. L. *et al.* Evaluation of the genotoxic potential of the *Casearia sylvestris* extract on HTC and V79 cells by the comet assay. **Toxicol. In Vitro**, v.18, p.337-342, jun. 2004.

MAISTRO, E. L. *et al.* *In vivo* evaluation of the mutagenic potential and phytochemical characterization of oleoresin from *Copaifera duckei* Dwyer. **Genetics and Molecular Biology**, Ribeirão Preto, v.28, n.4, p.833-838, oct./dec. 2005.

MAVOURNIN, K. H. *et al.* The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. **Mutation Research**, Amsterdam, v.239, p.29-38, 1990.

MEDEIROS, R. M. L.; CASCUM, R. M.; PEREIRA, J. F. S. Estudo do Aproveitamento da Casca da Banana (*Musa sapientum*, *Shum.*) na Produção de Farinha. Disponível em: <[http://www.estacio.br/graduacao/eng\\_alimentos/trab\\_finais/casca\\_de\\_banana.asp](http://www.estacio.br/graduacao/eng_alimentos/trab_finais/casca_de_banana.asp)> Acesso em: 24 jul. 2007.

MIYAJI, C. K. *et al.* Mushroom shiitake, is it mutagenic or antimutagenic agent. **Semina Cienc. Biol. Saude**, Londrina, v.22, p.11-17, jan./dez. 2001.

MONDAL, S. K. *et al.* Isolation, purification and some structural features of the mucilaginous exudates from *Musa paradisiaca*. **Fitoterapia**, v.72, p.263-271, 2001.

MOREIRA, R. S. **Banana: teoria e prática de cultivo**. Campinas: Fundação Cargil, 1997. 335 p.

NETO, J. X. A. *et al.* Avaliação do efeito mutagênico da palma da fogueira (*Opuntia ficus-indica* Mill) através do teste do micronúcleo em medula óssea de ratos *in vivo*. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, Paraíba, v.5, n.2, p.15-25, 2005.

NOVAK, F. R.; ALMEIDA, J. A. G. de; SILVA, R. de S. Banana peel: a possible source of infection in the treatment of nipple fissures. **J. Pediatr.**, Rio de Janeiro, v.79, n.3, p.221-226, maio/jun. 2003.

OLIVE, P. L. *et al.* Factors influencing DNA Migration from Individual Cells Subjected to Gel Electrophoresis. **Exper. Cell Res.**, New York, v.198, p.259-267, 1992.

RABELLO-GAY, M. N. *et al.* The effects of age, sex and diet on the clastogenic action of cyclophosphamide in mouse bone marrow. **Mutation Research**, Tokyo, v.158, n.3, p.181-188, 1991.

RAMPAZO, L. G. L. *et al.* Chlorophyllin antimutagenesis mechanisms under different treatment conditions in the micronucleous assay in V79 cells. **Cytologia**, Tokyo, v.67, n.3, p.323-327, jul. 2002.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Canoas: Editora da ULBRA, 2003. p. 355.

RIBEIRO, D. A. *et al.* Lack of DNA damage induced by fluoride on mouse lymphoma and human fibroblast cells by single cell gel (comet) assay. **Braz. Dent. J.**, Ribeirão Preto, v.17, n.2, p.91-94, 2006.

ROJAS, E.; LOPEZ, M. C.; VALVERDE, M. Single cell gel electrophoresis assay: methodology and applications. **Journal Chromatography B**, México, v.722, n.1-2, p.225-254, feb. 1999.

SALAMONE, M. *et al.* Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. **Mutation Research**, Amsterdam, v.74, p.347-356, 1980.

SÁNCHEZ-LAMAR, A. *et al.* Assessment of the potential genotoxic risk of *Phyllanthus orbicularis* HBK aqueous extract using in vitro and in vivo assays. **Toxicol Letters**, v.136, n.2, p.87-96, 2002.

SASAKI, Y. F. *et al.* Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. **Mutation Research**, Amsterdam, v.391, p.215-231, 1997.

SBMCTA. Sociedade Brasileira de Mutagenese, Carcinogênese e Teratogênese Ambiental. **Teste do micronúcleo de medula óssea de camundongo**. Disponível em: <<http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>>. Acesso em: 12 abr. 2007.

SCHENEIDER, C. L. **A Cura e a saúde pelos alimentos**. São Paulo: Casa Publicadora Brasileira, 1984. 507 p.

SCHER, R. *et al.* Avaliação do potencial genotóxico do Saião (*Kalanchoe brasiliensis*) em eritrócitos policromáticos de camundongos. **Genetics and. Mol. Biol.**, Ribeirão Preto, v.23, p. 696–697, 2000. Suppl.

SCHIMD, W. The micronucleus test. **Mutation Research**, Amsterdam, v.31, p.9-15, 1974.

SCHIMD, W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: HOLLAENDER, A. **Chemical mutagens: principles and methods for their detection**. 4. ed. New York: Plenum Press, 1976. cap. 4, p.31-53.

SELEMA, M. D.; FARAGO, M. E. Trace element concentrations in the fruit peels and trunks of *Musa paradisiaca*. **Phytochemistry**, v.42, p.1523-1525, abr. 1996.

SILVA, M. F. **Nomes vulgares de plantas da Amazônia**. Berlim: INPA, 1997. 222 p.

SINGH, N. P. *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. **Exper. Cell Research**, New York, v.175, p.184-191, 1988.

SOKAL, R. R.; ROHLF, F. J. **Biometry**: the principles and practice of statistics In biological research. W. H. Freeman San Francisco. 1995. p. 175 –205; 404 – 486.

SPEIT, G. *et al.* Detection of DNA effects in human cells with the comet assay and their relevance for mutagenesis. **Toxicology Letters**, v.88, p.91-98, nov. 1996.

SPEIT, G.; HARTMANN, A. The Comet Assay (SingleCell Gel Test) - A sensitive genotoxicity test for the detection of DNA damage and repair. In: HENDERSON, S. (Ed.). **Methods in Molecular Biology 113 DNArepairprotocols**: Eukaryotic Systems. Totowa: Humana Press, 1999. p. 203-212.

TAKAHASHI, C. S. *et al.* **Teste do micronúcleo em eritrócito de medula óssea de camundongo**. Disponível em: <<http://www.sbmcta.org.br/index.php?arq=doc01>>. Acesso em: 10 jan. 2007.

TICE, R. R. **Applications of biomonitoring for genotoxic Biomonitoring and biomarkers**. New York: Plenum Press, 1995. p. 69-79.

TICE, R. R. *et al.* Single cell gel Comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ Mol Mutagen**, New York, v.35, p.206-221, 2000.

VALOIS, A. C. A banana e sua funcionalidade como alimento. **Negócios**, São Luís, v.21, p.94-96, jul. 2006.

VINÍCIUS, M. **DNA**. Disponível em: <<http://www.universitario.com.br/celo/topicos/subtopicos/genetica/dna/dna.html>>. Acesso em: 20 maio 2007.

WIKIPEDIA. **Wikimedia Foundation: Cita a parte de agente mutagênico**. Disponível em: <<http://wikipedia.org/w/index.php?title=Agentemutag&oldid=92059>>. Acesso em: 11 mar. 2006.

ZAHA, A. *et al.* **Biologia Molecular Básica**. 3 ed. Porto Alegre: Editora Mercado Aberto Ltda., 1996. 333 p.

ZAMBRANO, M.A.; TARGA, H.J.; RABELLO-GAY, M.N.. Physiological saline solutions as a useful tool in micronucleous and metaphase slide preparations. **Stain Technology**, v.57, n.1, p.48-49, jan. 1982.

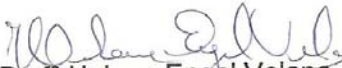
ZANONI, F. D. *et al.* Clastogenicity of the *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) bark wood extract in wistar rat bone marrow cells. **Cytologia**, Tokyo, v.70, n.3, p.303–308, 2005.



**ANEXO A – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****PARECER Nº 13A/2006**

O COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA – CEP, da UNIFENAS, Setor de Experimentação Animal, tendo analisado, nesta data, o protocolo do projeto de pesquisa intitulado **INVESTIGAÇÃO DO POTENCIAL GENOTÓXICO DO EXTRATO ETANÓLICO DE CASCA DE MUSA PARADISIACA**, de autoria da Profa. Cláudia Umbelina Baptista Andrade, resolveu enquadrá-lo na categoria de aprovado para fins de início da pesquisa.

Alfenas, 18 de outubro de 2006

  
Profª Helena Engel Velano  
Coordenadora do CEP

**APÊNDICE B – ARTIGO CIENTÍFICO****Mutagenicity of the *Musa paradisiaca* (Musaceae) fruit peels extract  
in mice peripheral blood cells *in vivo***

Claudia Umbelina Baptista Andrade\*, Fabio Ferreira Perazzo\*\*

and Edson Luis Maistro\*\*\*

\* UNIFENAS, Faculdade de Enfermagem, Alfenas, Minas Gerais, Brazil. 37130-000.

\*\* Universidade Federal do Amapá, Laboratório de Fármacos, Macapá, AP, Brazil.  
68902-280.

\*\*\*Universidade Estadual Paulista – UNESP – Faculdade de Filosofia e Ciências,  
Departamento de Fonoaudiologia, Marília, São Paulo, Brazil. 17525-900.

RUNNING HEAD: Mutagenic evaluation of *Musa paradisiaca*.

KEY WORDS: *Musa paradisiaca*, SCGE, micronucleus test, peripheral blood cells,  
comet assay.

Corresponding author: Edson Luis Maistro. UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
– UNESP – Faculdade de Filosofia e Ciências, Departamento de Fonoaudiologia.  
Av. Hygino Muzzi Filho, 737, Caixa Postal 181. Marília, SP, Brazil. 17525-900. FAX –  
55 14 34021302. E-mail: edson.maistro@marilia.unesp.br

## Abstract

Plants are a source of many biologically active products and nowadays they are of great interest to the pharmaceutical industry. In the present study, the mutagenic potential of the fruit peels extract from *Musa paradisiaca* was assessed using the single cell gel electrophoresis (SCGE) and micronucleus assays. Animals were treated orally with three different concentrations of the extract (1000, 1500 and 2000 mg/kg body weight). Peripheral blood cells of Swiss mice were collected 24 h after the treatment for the SCGE assay and 48 and 72 hr for the micronucleus test. The results showed that the extract of *M. paradisiaca* induced statistically significant increases in the average numbers of DNA damage in peripheral blood leukocytes for the two higher doses and a significant increase in the mean of the micronucleated polychromatic erythrocytes at three tested doses. The polychromatic/normochromatic erythrocytes ratio (PCE/NCE) scored in the tested groups was not statistically different from the negative control. The data obtained indicate that fruit peels extract from *M. paradisiaca* showed mutagenic effect in the peripheral blood cells of Swiss albino mice.

## Introduction

Since the beginning of civilization, people have used plants as medicine, because they are an important source of many biologically active products. Recently, there has been evidence of a growing interest in plants as a significant source of new pharmaceuticals. Many of today's drugs have been derived from plants, for example, digoxin from *Digitalis* spp., quinine and quinidine from *Chinchona* spp., vincristine and vinblastine from *Catharanthus roseus*, atropine from *Atropa belladonna*, morphine and codeine from *Papaver somniferum* (Rates, 2001). The medical and economical importance of plants has motivated several ethnopharmacological studies that have resulted in the discovery of many interesting properties of plants. Generally these properties are based on the studies of how native people use plants therapeutically (Barrett, 1994; Coe and Anderson, 1999). Different communities and cultures often use the same plant in different ways. Therefore, it is important that these uses should be investigated and also the risks that these products may pose to health have been recorded scientifically.

*Musa paradisiaca* L. (Musaceae), popularly known as "banana", is a perennial treelike herb widely distributed in moist tropics. Due to enriched food value and versatile medicinal value, banana is one of the most important fruits and vegetable crops of several countries. Fruits, leaves, peels, root and stalks from banana plants have been used by oral or topical via as a medicine to treat diarrhoea and dysentery, and in the healing of intestinal lesions in colitis (Stover and Simmonds, 1987), antilithiatic (Prasad *et al.*, 1993), inflammation, pains and snakebite (Coe and

Anderson, 1999), antiulcerogenic activity (Lewis *et al.*, 1999; Goel *et al.*, 2001), hypoglycemic effect (Ojewole and Adewunmi, 2003), hypolipidaemic and antioxidant actions (Krishnan and Vijayalakshmi, 2005). A constituent hydroxyanigorufone obtained from *M. paradisiaca* showed potential as a cancer chemopreventive agent (Jang *et al.*, 2002), and Houghton and Skari (1992) and Borges *et al.* (2005) have also reported the antivenom action of the stem juice from banana plant. Processes for the production of paper pulp, biogas, alcoholic beverages, etc., from banana plant have been also described (Tewari *et al.*, 1986). In this report, we determined a mutagenic response of the fruit peels extract from *M. paradisiaca* by measuring DNA damage by SCGE assay and the mean number of micronucleated cells by the micronucleus test on peripheral blood cells from mice *in vivo*.

## **Material and Methods**

### **Plant material**

Fresh peels (500 g) of *Musa paradisiaca* (banana) were air dried at 40 °C, powdered and extracted by maceration with water–ethanolic solution (4.0 l, 70.0%) during 2 days. The macerate was filtered, and the extraction procedure repeated. The concentration of the combined extracts under reduced pressure furnished 68.27 g (yield 13.65%) of crude water–ethanolic extract.

### **Chemicals**

The agent N-nitroso-N-ethylurea (ENU, CAS No. 759-73-9) was used as the DNA damaging agent in the SCGE and micronucleus assay using Swiss mice. It was dissolved in phosphate-buffer pH 6. The other main chemicals used were obtained from the following suppliers: normal melting point (NMP) agarose (Cat. No. 15510-019: Invitrogen); Low melting point (LMP) agarose (Cat. No. 15517-014: Invitrogen); Sodium salt *N*-lauroyl sarcosine (L-5125: Sigma) and Ethylenediaminetetraacetic acid EDTA (Merck).

### **Animals and assay procedures**

Experiments were carried out on Swiss mice (*Mus musculus*) 12 weeks old, weighing 25-30 g. The animals were acquired from the animal house of the José do Rosario Vellano University (UNIFENAS), kept in polyethylene boxes ( $n = 6$ ), in a climate-controlled environment ( $25 \pm 4^{\circ}\text{C}$ ,  $55 \pm 5\%$  humidity) with a 12h, light/dark cycle (7 a.m. to 7 p.m.). Food (LABINA-PURINA) and water were available *ad libitum*. Mice were divided into experimental groups of six animals, three females and three males each. *Musa paradisiaca* extract was administered in a single dose of 0.5ml by gavage at concentrations of 1.000, 1.500 and 2.000 mg/kg of body weight, chosen on the basis of our acute toxicity studies in mice, which was higher than 2000 mg/kg. The negative control group received distilled water. The positive control group received 50 mg of N-nitroso-N-ethylurea/kg. The Single cell gel electrophoresis test (SCGE) was carried out by the method described by Speit and Hartmann (1999), which is based on the original work of Singh *et al.* (1988), and includes modifications introduced by Klaude *et al.* (1996) as well as additional modifications. Twenty-four hours after the treatment peripheral blood leukocytes from Swiss mice were sampled.

A 10 µl aliquot of the blood cells from each animal was mixed with 120 µl of 0.5% low melting point agarose at 37°C, and rapidly spread onto microscope slides pre-coated with 1.5% normal melting point agarose. Coverslips were added and the slides were allowed to gel at 4°C for 20 min. The coverslips were removed gently and the slides were then immersed in cold, freshly prepared lysing solution consisting of 89 ml of a stock solution (2.5 M NaCl, 100 mM EDTA, 10 mM Tris, pH set to 10.0 with ~8g solid NaOH, 890 ml of distilled water and 1% sodium lauryl sarcosine), plus 1 ml of Triton X-100 (Merck) and 10 ml of DMSO. Protected from light, the slides were left to stand at 4°C for 1 h and then placed in the gel box, positioned at the anode end, and left in a high pH (>13) electrophoresis buffer (300 mM NaOH per 1 mM EDTA, prepared from a stock solution of 10 N NaOH and 200 mM, pH 10.0, EDTA) at 4°C for 20 min before electrophoresis to allow the DNA to unwind. Electrophoresis run was performed in an ice bath (4°C) for 20 min at 25 V and 300 mA. The slides were then submerged in a neutralization buffer (0.4 M Tris-HCl, pH 7.5) for 15 min, dried at room temperature and fixed in 100% ethyl alcohol for 10 min. The slides were dried and stored at least overnight before staining. For the process of staining, slides were briefly rinsed in distilled water, covered with 30 µl of 1x ethidium bromide staining solution prepared from a 10x stock (200µg/ml) and covered with a coverslip. The material was evaluated immediately at 400x magnification, using a fluorescence microscope (Nikon) with a 515-560 nm excitation filter and a 590 nm barrier filter. For the micronucleus (MN) assay, peripheral blood from the same animals used in the SCGE procedure was collected from the orbital vein 48 and 72 h after the treatment and then slides blood smears were made. All the slides were coded, fixed with methanol and stained with Giemsa solution. For micronucleus (MN), the presence of four thousand polychromatic erythrocytes were scored from each Swiss mice (2000

cells from 48 hr blood sample and 2000 cells from 72 hr blood sample). One thousand cells were analyzed per animal to determine polychromatic/normochromatic erythrocytes ratio. All animals were submitted to euthanasia after 72 h of blood sample collection. The Animal Bioethical Committee of the UNIFENAS, Brazil, approved the present study on September 28, 2006 (protocol number 13A/2006), in accordance with the Federal Government legislation on animal care.

### **Scoring procedures and data evaluation**

The extent and distribution of DNA damage indicated by the SCGE assay was evaluated by examining at least 100 randomly selected and non-overlapping cells on the slides per each animal. These cells were scored visually according to tail size into four classes (Figure 1), as follow: (1) class 0: undamaged, with no tail; (2) class 1: with a tail shorter than the diameter of the head (nucleus); (3) class 2: with a tail length 1 to 2x the diameter of the head; and (4) class 3: with a tail longer than 2x the diameter of the head. Comets with no heads and images with nearly all DNA in the tail, or with a very wide tail, were excluded from evaluation because they probably represented dead cells (Hartmann and Speit, 1997). The total score for 100 comets was obtained by multiplying the number of cells in each class by the damage class, ranging from 0 (all undamaged) to 300 (all maximally damaged).

### **Statistical Analysis**



The data obtained on micronucleus and SCGE assays were submitted to One-way analysis of variance test (ANOVA) and the Tukey-Kramer multiple comparison test (Sokal and Rohlf, 1995), using the GraphPad Instat<sup>®</sup> software (version 3.01). Results were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

## Results and discussion

The alkaline single cell gel electrophoresis (SCGE) (Comet) assay is a rapid and sensitive procedure for quantitating DNA damage in mammalian cells (Singh *et al.*, 1988; Sasaki *et al.*, 1997). In this assay, relaxed and broken DNA fragments stream further from the nucleus than intact DNA, so the extent of DNA damage can be measured by the length of the stream. Furthermore, DNA lesions can be measured in the absence of mitotic activity.

Table 1 shows the effects of a 24 h treatment with the *M. paradisiaca* extract on DNA migration in peripheral blood leukocytes from Swiss albino mice on the comet assay. As expected, N-nitroso-N-ethylurea agent used as positive control lead to some fragmentation and migration of the fragments in the SCGE assay of peripheral blood leukocytes. Significant effects on DNA migration were found at the two higher *M. paradisiaca* extract concentrations tested in leukocytes. The 1000 mg/kg dose of the extract produced some DNA damage in the cells but this increase was not statistically significant. When cells were exposed to the test extract, most cells examined on slides were undamaged (class 0), few cells showed minor damage (class 1) and very few showed a large amount of damage (class 2 and 3).

Furthermore, there was significant difference in DNA migration among the three extract concentrations tested (Table 1).

To have a comparison parameter with the SCGE assay we also applied in this work a micronucleus test. The most attractive features of this assay are the rapidity and ease with which *in vivo* genetic activity can be demonstrated and the knowledge that these events, being chromosomal in nature, are likely to be significant ones in terms of human risk (Salamone *et al.*, 1980; Mavournin *et al.*, 1990).

Table 2 shows the micronucleus test results obtained for female and male Swiss mice treated with *M. paradisiaca* extract: the number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) of each animal and means, for untreated controls and treated animals. The results obtained showed statistically significant increase of the average number of micronucleated polychromatic erythrocytes at three tested doses of the plant extract. This table also shows the ratio between the average number of polychromatic erythrocytes (PCE) with respect to normochromatic erythrocytes (NCE) on 1000 randomly cells analyzed from each animal. The increased number of micronucleated cells was not associated with cytotoxicity because the polychromatic/normochromatic erythrocyte ratio was not significantly decreased at any tested doses.

The phytochemistry screen of *M. paradisiaca* extracts have shown the presence of several polysaccharides. The stalk of the rhizome (scape) of *M. paradisiaca* contains at least four different polysaccharide fractions. Its analysis indicated that the scape is essentially a solid state gel containing ~1.5% polyphenols and ~10% of polysaccharides(D-Glc, L-Ara, D-Xyl, D-Glucan), the rest being water (~88.5%) in association with minerals, potassium, silica, lignin and polyphenolic pigments (Anjaneyalu *et al.*, 1997). Methanol extract of the fruits contain

diarylheptanoid, 1,2-diyidro-1,2,3-trihydroxy-9-(4-methoxyphenyl)phenalene, hydroxyanigorufone, 2-(4-hydroxyphenyl)naphthalic anhydride and 1,7-bis(4-hydroxyphenyl)-hepta-e(E),6(E)-dien-3-one (Jang *et al.*, 2002). Mucilaginous exudate from pseudo-stem contains uronic acid, neutral sugars, proteins, rhamnose, arabinose, xylose, mannose, galactose, glucose, besides the other specific sugars (Mondal *et al.*, 2001). The trace element concentrations of the fruit peels and trunks was described by Selema and Farago (1996), however, there are not data about *M. paradisiaca* fruit peels extract in the literature.

Many studies have shown positive results of mutagenic action of plant extracts (Sánchez-Lamar *et al.*, 2002; Zanoni *et al.*, 2005; among others). Studies such as ours indicate the importance of scientifically security evaluating the products used in popular medicine, and especially those derived from plants. The mutagenic effect of fruit peels extract from *M. paradisiaca* on peripheral blood cells of Swiss mice was studied for the first time in the present work. The results indicated that this crude extract presented mutagenic effect in blood cells. As fruit peels extract from *M. paradisiaca* is included in the common folk medicine used by numerous individuals it seems advisable to moderate its use, and to develop other mutagenic tests to finally establish the health risk for humans.

### **Acknowledgments**

We would like to thank the Brazilian agencies CNPq (306544/2006-7), FAPESP (2006/57514-2) and FAPEMIG (Rede Mineira de Ensaios Toxicológicos e Farmacológicos de Produtos Terapêuticos, EDT – 1879/02) for the financial support of this study and Lucimara Maria da Silva for her technical assistance.

## References

- Anjaneyalu YV, Jagadish RL and Raju TS (1997) Polysaccharide components from the scape of *Musa paradisiaca*: main structural features of water-soluble polysaccharide component. *Glycoconjugate Journal* 14:507-512.
- Barrett B (1994) Medicinal plants of Nicaragua's Atlantic Coast. *Economic Botany* 48:8-20.
- Borges, MH, Alves DLF, Raslan DS, Piló-Veloso D, Rodrigues VM, Homs-Brandeburgo MI and Lima ME (2005) Neutralizing properties of *Musa paradisiaca* L. (Musaceae) juice on phospholipase A2, myotoxic, hemorrhagic and lethal activities of crotalidae venoms. *J Ethnopharmacol* 98:21-29.
- Coe FG and Anderson GJ (1999) Ethnobotany of the Sumu (Ulwa) of Southeastern Nicaragua and comparisons with Mikitu plant lore. *Economic Botany* 53:363-386.
- Goel RK, Sairam K and Rao CV (2001) Role of gastric antioxidant and anti-*Helicobacter pylori* activities in antiulcerogenic activity of plantain banana (*Musa sapientum* var. *paradisiaca*). *Indian J Exp Biol* 39(7):719-722.
- Hartmann A and Speit G (1997) The contribution of cytotoxicity to DNA-effects in the single cell gel test (comet assay). *Toxicol Lett* 90:183-188.
- Houghton PJ and Skari K (1992) The effect of Indian plants used against snakebite on blood clotting. *J Pharm Pharmacol* 44:1054-1060.
- Jang DS, Park EJ, Hawthorne ME, Vigo JS, Graham JG, Cabieses F., Santarsiero BD, Mesecar AD, Fong HHS, Mehta RG, Pezzuto JM and Kinghorn AD (2002) Constituents of *Musa x paradisiaca* cultivar with the potential to induce the phase II enzyme, quinone reductase. *J Agric Food Chem* 50(22):6330-6334.

- Klaude M, Eriksson S, Nygren J and Ahnström G (1996) The comet assay: Mechanisms and technical considerations. *Mutat Res* 363:89-96.
- Krishnan K and Vijayalakshmi NR (2005) Alterations in lipids & lipid peroxidation in rats fed with flavonoid rich fraction of banana (*Musa paradisiaca*) from high background radiation area. *Indian J Med Res* 122:540-546.
- Lewis DA, Fields WN and Shaw GP (1999) A natural flavonoid present in unripe plantain banana pulp (*Musa sapientum* L. var. *paradisiaca*) protects the gastric mucosa from aspirin-induced erosions. *J Ethnopharm* 65:283-288.
- Mavournin KH, Blakey DH, Cimino MC, Salamone MF and Heddle JA (1990) The in vivo micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. A report of the US Environmental Protection Agency Gene-Tox Program. *Mutat Res* 239:29-80.
- Mondal SK, Ray B, Thakur S and Ghosal PK (2001) Isolation, purification and some structural features of the mucilaginous exudates from *Musa paradisiaca*. *Fitoterapia* 72:263-271.
- Ojewole JA and Adewunmi CO (2003) Hypoglycemic effect of methanolic extract of *Musa paradisiaca* (Musaceae) green fruits in normal and diabetic mice. *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 25(6):453-456.
- Prasad KV, Bharathi K and Srinivasan KK (1993) Evaluation of *Musa* (Paradisiaca Linn. Cultivar) – “Puttubale” stem juice for antilithiatic activity in albino rats. *Indian J Physiol Pharmacol* 37(4):337-341.
- Rates SMK (2001) Plants as source of drugs. *Toxicon* 39:603-613.

- Salamone M, Heddle J, Stuart E and Katz M (1980) Towards an improved micronucleus test: studies on 3 model agents, mitomycin C, cyclophosphamide and dimethylbenzanthracene. *Mutat Res* 74:347-356.
- Sánchez-Lamar A, Fuentes JL, Fonseca G, Cápiro N, Ferrer M, Alonzo A, Baluja L, Cozzi R, De-Salvia R, Fiore M and Llagostera M (2002) Assessment of the potential genotoxic risk of *Phyllanthus orbicularis* HBK aqueous extract using in vitro and in vivo assays. *Toxicol Letters* 136:87-96.
- Sasaki YF, Tsuda S, Izumiyama F and Nishidate E (1997) Detection of chemically induced DNA lesions in multiple mouse organs (liver, lung, spleen, kidney, and bone marrow) using the alkaline single cell gel electrophoresis (Comet) assay. *Mutat Res* 388:33-44.
- Selema MD and Farago ME (1996) Trace element concentrations in the fruit peels and trunks of *Musa paradisiaca*. *Phytochemistry* 42:1523-1525.
- Singh NP, McCoy MT, Tice RR, and Schneider EL (1988) A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Exp Cell Res* 175:184-191.
- Sokal RR and Rohlf FJ (1995) In: W.H. Freeman (Ed.), *Biometry*. San Francisco, pp. 175 –205; 404 – 486.
- Speit G and Hartmann A (1999) The comet assay (single-cell gel test), in: Henderson, D.S. (Ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 113, *DNA Repair Protocols: Eukaryotic Systems*, Humana Press Inc., Totowa, NJ, pp. 203-212.
- Stover RH and Simmonds NW (1987) *Bananas*, Tropical Agriculture Series, 3<sup>rd</sup> edition. Longman Scientific & Technical: Essex, UK, pp 86-101.
- Tewari HK, Marwaha SS and Rupal K (1986) Ethanol from banana peels. *Agricultural Wastes* 16(2):135-146.

Zanoni FD, Andrade SF, Bastos JK and Maistro EL (2005) Clastogenicity of the *Austroplenckia populnea* (Celastraceae) bark wood extract in Wistar rat bone marrow cells. *Cytologia* 70(3):303-308.

Table 1 – DNA migration in the comet assay for the assessment of genotoxicity of *Musa paradisiaca* extract in peripheral blood leukocytes (collected 24 h after the treatment) from female (F) and male (M) Swiss mice *in vivo*.

Treatments	Animals	Total <sup>1</sup>	Comet class				Scores
			0	1	2	3	
Control	F <sub>1</sub>	3	97	3	0	0	3
	F <sub>2</sub>	3	97	3	0	0	3
	F <sub>3</sub>	1	99	1	0	0	1
	M <sub>1</sub>	5	95	5	0	0	5
	M <sub>2</sub>	2	98	2	0	0	2
	M <sub>3</sub>	4	96	4	0	0	4
		<b>3.0 ± 1.41</b>	<b>97.0 ± 1.41</b>	<b>3.0 ± 1.41</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>3.0 ± 1.41</b>
<i>M. paradisiaca</i> extract (1.000 mg/Kg)	F <sub>1</sub>	6	94	6	0	0	6
	F <sub>2</sub>	8	92	8	0	0	8
	F <sub>3</sub>	5	95	5	0	0	5
	M <sub>1</sub>	9	91	9	0	0	9
	M <sub>2</sub>	9	91	9	0	0	9
	M <sub>3</sub>	4	96	4	0	0	4
		<b>6.83 ± 2.13</b>	<b>93.1 ± 2.13</b>	<b>6.83 ± 2.13</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>0 ± 0</b>	<b>6.83 ± 2.13</b>
<i>M. paradisiaca</i> extract (1.500 mg/Kg)	F <sub>1</sub>	19	81	10	6	3	31
	F <sub>2</sub>	20	80	10	5	5	35
	F <sub>3</sub>	12	88	7	3	2	19
	M <sub>1</sub>	14	86	7	7	0	21
	M <sub>2</sub>	16	84	7	5	4	29
	M <sub>3</sub>	32	68	21	10	1	44
		<b>18.8***± 7.11</b>	<b>81.1***± 7.11</b>	<b>10.3* ± 5.42</b>	<b>6.0* ± 2.36</b>	<b>2.5 ± 1.87</b>	<b>29.8** ± 9.2</b>
<i>M. paradisiaca</i> extract (2.000 mg/Kg)	F <sub>1</sub>	35	65	22	8	5	53
	F <sub>2</sub>	20	80	17	1	2	25
	F <sub>3</sub>	35	65	11	13	11	70
	M <sub>1</sub>	26	74	14	5	7	65
	M <sub>2</sub>	32	68	19	10	3	48
	M <sub>3</sub>	25	75	13	5	7	64
		<b>28.8***± 6.11</b>	<b>71.1***± 6.11</b>	<b>16.0*** ± 4.09</b>	<b>7.0* ± 4.24</b>	<b>5.8 ± 3.25</b>	<b>54.1***± 16.4</b>
N-Nitroso-N-Ethylurea (50 mg/Kg)	F <sub>1</sub>	93	7	14	25	54	226
	F <sub>2</sub>	79	21	18	23	38	178
	F <sub>3</sub>	80	20	8	37	35	187
	M <sub>1</sub>	82	18	11	31	40	193
	M <sub>2</sub>	81	19	19	33	29	172
	M <sub>3</sub>	83	17	11	31	41	196
<b>Mean +</b>		<b>83.0***± 5.09</b>	<b>17.0***± 5.09</b>	<b>13.5***± 4.32</b>	<b>30.0***± 5.1</b>	<b>39.5***± 8.3</b>	<b>192***± 18.9</b>

\* Significantly different from negative control (P < 0.05).

\*\* Significantly different from negative control (P < 0.01).

\*\*\* Significantly different from negative control (P < 0.001).

<sup>1</sup>Total number of cells with damage (class 1+2+3).



Table 2 – Number of micronucleated polychromatic erythrocytes (MNPCE) observed in the peripheral blood cells of female (F) and male (M) Swiss mice treated with a *Musa paradisiaca* extract, and respective controls. For each time period (48 and 72 h) 2000 cells were analyzed. SDM = standard deviation of the mean.

Treatments	Blood collect time	Number of MNPCE per Animal						Mean MNPCE $\pm$ SDM	PCE/NCE Mean $\pm$ SDM
		F <sub>1</sub>	F <sub>2</sub>	F <sub>3</sub>	M <sub>1</sub>	M <sub>2</sub>	M <sub>3</sub>		
Negative control (water)	48 h	3	2	5	3	2	3	3.0 $\pm$ 1.09	2.62 $\pm$ 0.59
	72 h	3	4	1	3	3	6	3.33 $\pm$ 1.63	2.07 $\pm$ 0.24
<i>Musa paradisiaca</i> (1000 mg/kg)	48 h	6	9	7	4	8	8	7.0*** $\pm$ 1.78	2.10 $\pm$ 0.50
	72 h	6	8	7	6	4	6	6.16* $\pm$ 1.32	1.97 $\pm$ 0.46
<i>Musa paradisiaca</i> (1500 mg/kg)	48 h	11	7	8	7	7	9	8.16*** $\pm$ 1.60	3.17 $\pm$ 0.90
	72 h	6	7	7	7	9	6	7.0** $\pm$ 1.09	2.27 $\pm$ 1.03
<i>Musa paradisiaca</i> (2000 mg/kg)	48 h	7	10	8	8	6	7	7.66*** $\pm$ 1.36	1.62 $\pm$ 0.17
	72 h	9	9	7	8	7	11	8.5*** $\pm$ 1.51	2.40 $\pm$ 0.62
Positive control N-Nitroso-N-Ethylurea (50 mg/kg)	48 h	12	15	10	12	12	11	12.0*** $\pm$ 1.67	1.98 $\pm$ 0.78
	72 h	11	9	12	10	11	12	10.83*** $\pm$ 1.16	1.93 $\pm$ 0.41

\* Significantly different from negative control (P < 0.05).

\*\* Significantly different from negative control (P < 0.01).

\*\*\* Significantly different from negative control (P < 0.001).