

**UNIVERSIDADE DE ARARAQUARA – UNIARA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA
REGENERATIVA E QUÍMICA MEDICINAL**

JULIANA GONELLA FORNIELLES DA SILVA

**Avaliação in vitro do potencial citotóxico, genotóxico, antioxidante e do
efeito quimiopreventivo de filmes de *Citrullus lanatus* Thunb (melancia) e
Cucumis melo L. (melão)**

Araraquara

2022

JULIANA GONELLA FORNIELLES DA SILVA

Avaliação in vitro do potencial citotóxico, genotóxico, antioxidante e do efeito quimiopreventivo de filmes de *Citrullus lanatus* Thunb (melancia) e *Cucumis melo* L. (melão)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal da Universidade de Araraquara – UNIARA – como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia, Área de Concentração: Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira

Co-orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

Araraquara, SP

2022

FICHA CATALOGRÁFICA

S58a Silva, Juliana Gonella Forniellas da
Avaliação in vitro do potencial citotóxico, genotóxico, antioxidante e do efeito quimiopreventivo de filmes de *Citrullus Lanatus Thunb* (melancia) e *Cucumis Melo L.* (melão)/Juliana Gonella Forniellas da Silva - Araraquara: Universidade de Araraquara, 2022.

76f.

Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química medicinal – UNIARA

Orientadora: Profa. Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira
Co-Orientador: Prof. Dr. Hernane da Silva Barud

1. *Cucumis melo L.* 2. *Citrullus lanatus*. 3. Antimutagenicidade. 4. Mutagenicidade. 5. Citotoxicidade. I. Título.

CDU 577.4

JULIANA GONELLA FORNIELLES DA SILVA

Dissertação apresentada a Universidade de Araraquara UNIARA, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestra em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal.

Araraquara, 16 de fevereiro de 2022

BANCA EXAMINADORA



Profª Drª FLÁVIA APARECIDA RESENDE NOGUEIRA (Orientadora)
Universidade de Araraquara - UNIARA



Prof. Dr. RODRIGO ALVARENGA REZENDE
Universidade de Araraquara - UNIARA



Profª. Drª. RAQUEL ALVES DOS SANTOS
Universidade de Franca - UNIFRAN

Dedicatória

A minha mãe Creuza, que foi o meu alicerce durante toda a vida. Que sempre estive pronta para ser meu esteio nas horas difíceis, que me direcionou o caminho correto com amor e carinho quando muitas vezes eu me sentia perdida. Que além de ser minha mãe assumiu o papel de pai e o fez com um amor incondicional que só as mães sabem fazer. Foi avó e mãe do João Matheus nas diversas horas em que estive ausente. Obrigada por tudo minha guerreira, sem você mais essa conquista não seria possível. Que Deus possa te dar muitos anos de vida com lucidez e saúde para que juntas possamos compartilhar os bons momentos que a vida nos oferecer.

Te Amo além dessa vida ...

Agradecimentos

Primeiramente agradeço a Deus pelo dom da vida e por me permitir chegar até aqui.

À professora Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira, por ter me acolhido como sua orientanda, mesmo eu sendo de outra área. Obrigada por acreditar em mim. Um agradecimento especial pela sua paciência e por compartilhar comigo tanto conhecimento, por me direcionar e orientar quando eu me sentia perdida, por me incentivar quando muitas vezes pensei em desistir. Por me ensinar a rotina de laboratório, por praticamente pegar na minha mão, para que eu pudesse concretizar esse sonho. Que Deus abençoe sua vida e que você continue colhendo os frutos desse lindo trabalho, que faz com tanto amor e seriedade, que contagia os que estão a sua volta e os faz sentirem a mesma paixão que você. Enfim, mais uma vez obrigado por todos os ensinamentos e momentos compartilhados ao longo dessa jornada.

Ao professor Dr. Hernane da Silva Barud, meu co-orientador, pela ajuda e ensinamentos compartilhados.

Ao professor Dr. André Capaldo Amaral, pelo apoio no início dessa jornada, saiba que você foi fundamental para a realização desse sonho. Meus sinceros agradecimentos e que Deus abençoe a sua vida imensamente.

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, aos professores que puderam compartilhar toda a sua experiência nesses anos, para o meu crescimento profissional. Muito obrigada.

As funcionárias do departamento de Pós-Graduação da Uniara, Sandra, Rosana e Laura (que hoje trabalha em outro setor), meus sinceros agradecimentos por estarem sempre prontas a tirar minhas dúvidas e me ajudar durante a minha trajetória.

A BioSmart Nanotechnology e ao professor Dr. Diógenes dos Santos Dias, pela parceria e por fornecer os filmes de melão e melancia. Obrigada por confiar no nosso trabalho.

A minha amiga de laboratório GABI (Gabriela Gasparoti), pela amizade, pelos momentos compartilhados, pelo café (ela sabe que eu amo café e levava uma garrafinha todo dia), pela sua ajuda, sem você não teria conseguido. Muito obrigada!!!

A minha família, por estar sempre ao meu lado, me apoiando e não me deixando desistir, quando as dificuldades apareciam. Vocês foram fundamentais para a realização desse trabalho.

A minha mãe Creuza, por ser o meu suporte, meu alicerce, minha base e por sempre acreditar em mim. TE AMO!!

Ao meu marido Reynaldo, pelo apoio e incentivo, por aceitar minhas ausências, para que eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida. Te amo Rey!!!

Ao meu filho João Matheus, por estar sempre ao meu lado e respeitar as horas em que eu ficava estudando e você queria que eu fizesse alguma coisa com você. Ele sempre perguntava. – Mãe quando acaba esse seu mestrado? Finalizamos João, nós vencemos mais essa etapa. Te amo muito meu filho!!!

As minhas amoras Angélica, Karina, Patrícia e Thaisa, minhas irmãs de coração, obrigada por vocês existirem na minha vida, por toda alegria que podemos compartilhar juntas, vocês fazem os meus dias serem mais leves. Amo vocês!!

Obrigada a todos por fazerem parte desse momento tão especial, dessa conquista, não tenho palavras para agradecer o apoio que me foi dado nesses anos de aprendizado.

“As mãos que ajudam são mais sagradas do que os lábios que rezam”

Madre Tereza de Calcutá

“Tenha sempre presente que a pele se enruga, o cabelo embranquece, os dias
convertem-se em anos...

Mas o que é importante não muda...a tua força e convicção não tem idade.
O teu espírito é como qualquer teia de aranha. Atrás de cada linha de chegada,
há uma de partida.

Atrás de cada conquista, vem um novo desafio.

Enquanto estiver vivo, sinta-se vivo.

Se sentir saudades do que fazia, volte a fazê-lo.

Não viva de fotografias amareladas...

Continue quando todos esperam que desista.

Não deixe que enferruje o ferro que existe em você.

Faça com que, em vez de pena, tenham respeito por você.

Quando não conseguir correr através dos anos, trote.

Quando não conseguir trotar, caminhe.

Quando não conseguir caminhar, use uma bengala.

Mas nunca, nunca se detenha!”

Madre Teresa de Calcutá

RESUMO

SILVA, Juliana Gonella Forniellas da. “**Avaliação in vitro do potencial citotóxico, genotóxico, antioxidante e do efeito quimiopreventivo de filmes de *Citrullus lanatus* Thunb (melancia) e *Cucumis melo* L. (melão).**” 2022. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal) Universidade de Araraquara.

O uso de biomateriais, filmes e recobrimentos biodegradáveis a partir de frutas, plantas e vegetais, tornou-se atrativo e amplamente utilizado. Por serem de fontes naturais e com alta taxa de reciclagem e biodegradação, diminuem os resíduos descartados no meio ambiente e contribuem para um desenvolvimento sustentável. Frente as diversas aplicabilidades em vários setores da indústria, o objetivo deste trabalho foi investigar a atividade antiproliferativa, antioxidante, mutagênica e antimutagênica de filmes de *Cucumis melo* L. (melão) e *Citrullus lanatus* Thunb (melancia) nomeados lavados e não lavados. Para tanto, os ensaios foram realizados com eluatos preparados como recomendado pela ISO 10993-12 (6 cm² dos filmes em 1 mL do veículo de extração). A viabilidade celular foi avaliada pelo ensaio do MTT (metil tiazolil tetrazólio) frente a fibroblastos de pulmão humano (GM-07492A) e a uma linhagem de células com perfil metabólico – carcinoma hepatocelular humano (HepG2), em diferentes tempos de tratamento (4, 24, 48 e 72 horas). A atividade antioxidante foi investigada pelo ensaio ABTS (2,2'-azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)) e para a avaliação da mutagenicidade foi feito os testes de Ames nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella* Typhimurium em experimentos com (S9+) e sem (S9) ativação metabólica e do micronúcleo (MN). Por fim, o efeito protetor contra o mutágeno benzo[a]pireno (B[a]P) também foi avaliado pelo teste de Ames, usando a linhagem TA98 em experimentos com metabolização. Com relação aos resultados obtidos, de uma maneira geral, tanto os filmes de melão como os de melancia não lavados foram mais citotóxicos do que os lavados, em ambas as células. O potencial citotóxico foi mais evidente nas maiores concentrações testadas, com variações com relação aos tempos de tratamento. Os filmes de melão apresentaram maior potencial antioxidante do que os filmes de melancia e a maior porcentagem de inibição da mutagenicidade induzida pelo B[a]P foi observada no tratamento com o melão não lavado (53,5%) na maior concentração avaliada. Além disso, não foram mutagênicos nas condições experimentais utilizadas. Como conclusão, a análise dos parâmetros toxicológicos realizada neste estudo apoia a segurança de uso dos filmes de melão e melancia, principalmente dos lavados, em benefícios para o homem. Tais materiais podem ser explorados para a aplicação como revestimentos em diversos segmentos da indústria alimentícia e farmacêutica, como por exemplo, filmes alimentícios, embalagens biodegradáveis e substratos para sistema de entrega de drogas.

Palavras-chave: *Cucumis melo* L., *Citrullus lanatus*, antimutagenicidade, mutagenicidade, citotoxicidade.

ABSTRACT

SILVA, Juliana Gonella Forniellas da. **“In vitro evaluation of the cytotoxic, genotoxic, antioxidant potential and chemopreventive effect of *Citrullus lanatus* Thunb (watermelon) and *Cucumis melo* L. (melon) films.”** 2022. Dissertation (Master in Biotechnology in Regenerative Medicine and Medicinal Chemistry) University of Araraquara.

The use of biodegradable biomaterials, films and coatings from fruits, plants and vegetables has become attractive and widely used. As they come from natural sources and have a high rate of recycling and biodegradation, they reduce waste discarded in the environment and contribute to sustainable development. In view of the diverse applicability in various sectors of the industry, the objective of this work was to investigate the antiproliferative, antioxidant, mutagenic and antimutagenic activity of films of *Cucumis melo* L. (melon) and *Citrullus lanatus* Thunb (watermelon) named washed and unwashed. Therefore, the tests were performed with eluates prepared as recommended by ISO 10993-12 (6 cm² of the films in 1 mL of the extraction vehicle). Cell viability was evaluated by the MTT (methyl thiazolyl tetrazolium) assay against human lung fibroblasts (GM-07492A) and a cell line with a metabolic profile - human hepatocellular carcinoma (HepG2), at different treatment times (4, 24, 48 and 72 hours). The antioxidant activity was investigated by the ABTS assay (2,2'-azinobis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)) and for the evaluation of mutagenicity, the Ames test was performed on the strains TA97a, TA98, TA100 and TA102 of *Salmonella* Typhimurium in experiments with (S9+) and without (S9) metabolic activation and micronucleus (MN) assay. Finally, the protective effect against the mutagen benzo[a]pyrene (B[a]P) was also evaluated by the Ames test, using the TA98 strain in experiments with S9. Regarding the results obtained, in general, both unwashed melon and watermelon films were more cytotoxic than washed ones, in both cells. The cytotoxic potential was more evident at the highest concentrations tested, with variations in terms of treatment times. Melon films showed higher antioxidant potential than watermelon films and the highest percentage of inhibition of mutagenicity induced by B[a]P was observed in the treatment with unwashed melon (53.5%) at the highest concentration evaluated. Furthermore, they were not mutagenic under the experimental conditions. In conclusion, the analysis of toxicological parameters carried out in this study supports the safety of using melon and watermelon films, especially washed ones, in terms of benefits for humans. Such materials can be explored for application as coatings in various segments of the food and pharmaceutical industry, such as food films, biodegradable packaging and substrates for drug delivery systems.

Key words: *Cucumis melo* L., *Citrullus lanatus*, antimutagenicity, mutagenicity, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Cucumis melo L.....	18
Figura 2 - Citrullus lanatus (Thunb).....	20
Figura 3 - Partes aéreas de Citrullus lanatus.....	21
Figura 4 - Princípio do ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese. 1. Núcleo com DNA danificado. 2. Inibição de citocinese pela adição de citocalasina B. 3. A frequência de MN é pontuada apenas em células binucleadas. Parte superior - células binucleadas de controle sem MN, parte inferior – duas células binucleadas com 1 ou 6 MN visíveis no citoplasma...25	
Figura 5 - Estabilização do radical (ABTS•+) por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.....	26
Figura 6 - A. Filme de melão lavado B. Filme de melão não lavado C. Filme de melancia lavado D. Filme de melancia não lavado.....	29
Figura 7 - A. Células HepG2 B. Células GM-07492A.....	31
Figura 8 - Células CHO-K1	31
Figura 9 - Esquema de plaqueamento dos filmes de melancia e melão	32
Figura 10 - A. Tratamento com DMSO; B. Tratamento com mitomicina C, ambos na linhagem TA102 de S. Typhimurium	34
Figura 11 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 (A) e GM-07492A (B) tratadas com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes não lavados de melão.....	40
Figura 12 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 (A) e GM-07492A (B) tratadas com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes lavados de melão	43
Figura 13 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 (A) e GM-07492A (B) tratadas com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes não lavados de melancia.....	46
Figura 14 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 (A) e GM-07492A (B) tratadas com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes lavados de melancia.....	48
Figura 15 - Curva padrão de Trolox.....	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de Salmonella Typhimurium após o tratamento com diferentes volumes de eluatos de filmes de melão não lavados e lavados, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica	51
Tabela 2 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de Salmonella Typhimurium após o tratamento com diferentes volumes de eluatos de filmes de melancia não lavados e lavados, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.	52
Tabela 3 - Frequência de micronúcleos (MNs) e índice de proliferação com bloqueio de citocinese (IPBC) em células CHO após 4 horas de tratamento e HepG2 após 24 horas de tratamento com os eluatos dos filmes de melão e melancia (lavados e não lavados).....	54
Tabela 4 - Atividade antimutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e a porcentagem de inibição frente ao mutágeno benzo[a]pireno na linhagem TA98 de Salmonella Typhimurium tratadas com filmes de melancia e melão (não lavados)	56
Tabela 5 - Atividade antioxidante das amostras expressa em quantidade equivalente de Trolox por grama de filme (μM trolox/g).....	57

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ABTS^{•+} - 2,2'azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
ANOVA – Análise de Variância
AT – Adenina-Timina
B[a]P – Benzoapireno
BNs – células binucleadas
CHO-K1 – Células de ovário de Hamster Chinês
C. lanatus – *Citrullus lanatus*
C. melo – *Cucumis melo*
CO₂ – dióxido de carbono
CYP1A1 – família do citocromo P450
DMEM – *Dulbecco's modification of Eagle's medium*
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – ácido desoxirribonucleico
DP – Desvio padrão
EROs – Espécies reativa de oxigênio
EUA – Estados Unidos da América
GC – Guanina-Citosina
GM-07492A – Célula de fibroblasto de pulmão humano
H₂O₂ – peróxido de hidrogênio
HepG2 – Célula de hepato carcinoma celular humano
His - - Ausência do aminoácido histidina
IM – Índice de Mutagenicidade
IPBC -Índice de proliferação com bloqueio da citocinese
KCL – cloreto de potássio
K₂S₂ – persulfato de potássio
L – Lavado
L· – radical lipídico
M – Média
MiliQ – água ultrapura tipo I
mM - Milimolar
mL - mililitro
MN – Micronúcleo
MTT – Metil tiazolil tetrazólio
NL – Não lavado
nm - nanômetro
OECD – Organização para a Cooperação e Desenvolvimento Econômico
O₂ – oxigênio
O₂^{•-} - ânion superóxido
OH – radical hidroxila
ON – óxido nítrico
PBS – *Phosphate Buffered Saline*
ppm – parte por milhão
rpm – rotação por minuto
SBF – Soro Bovino Fetal
S. Typhimurium – *Salmonella Typhimurium*
S9 - Fração microsossomal
TA97a, TA98, TA100, TA102 – cepas de *Salmonella Typhimurium*

UFC – Unidade Formadora de Colônias

μL – microlitro

μg - micrograma

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Filmes provenientes de fontes renováveis.....	16
1.2 <i>Cucumis melo</i> L. (melão)	18
1.3 <i>Citrullus lanatus</i> Thunb (melancia)	19
1.4 Ensaio de Toxicidade	22
1.4.1 Citotoxicidade	22
1.4.2 (Anti) Genotoxicidade	23
1.5 Atividade Antioxidante	25
2. OBJETIVOS	
2.1 Objetivo Geral	27
2.2 Objetivos Específicos.....	27
3. MATERIAL E MÉTODOS	
3.1 Obtenção das Amostras	28
3.2 Preparação dos Eluatos.....	29
3.3 Linhagens celulares e condições de cultura	30
3.4 Avaliação da Citotoxicidade	31
3.5 Avaliação da Mutagenicidade	33
3.5.1 Teste de Ames	33
3.5.2 Ensaio do Micronúcleo	34
3.6 Avaliação da Antimutagenicidade.....	36
3.7 Ensaio de Atividade Antioxidante	37
4. RESULTADOS.....	39
4.1 Viabilidade celular	39
4.2 Teste de Ames.....	50
4.3 Ensaio do Micronúcleo.....	53
4.4 Antimutagenicidade	55
4.5 Atividade Antioxidante	57
5. DISCUSSÃO	58
6. CONCLUSÃO	65
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	66

1. INTRODUÇÃO

O crescimento econômico global e as melhorias nos padrões de vida, resultaram em um aumento no poder de compras e contribuíram para o aumento na produção de plásticos e resíduos descartados, ocasionando grandes problemas ambientais. Este é um tema atual e abordado em vários fóruns por todo o mundo, gerando debates na busca de soluções economicamente e ecologicamente corretas e viáveis relacionado a essa preocupação com o meio ambiente (NARANCIC *et al.*, 2020; EMADIAN *et al.*, 2017).

Os plásticos representam uma grande família de polímeros, sendo a maioria deles derivados de recursos fósseis, que são amplamente utilizados em vários setores da indústria, principalmente em embalagens, pois apresentam características e propriedades interessantes, como baixo custo, durabilidade, resistência e baixo peso (NARANCIC *et al.*, 2020; EMADIAN *et al.*, 2017). No entanto, tornou-se crucial a busca por um modelo de produção consciente (BARROS, 2016), bem como, a diminuição do descarte de rejeitos e materiais oriundos de indústrias ou do consumo humano, em virtude dos prejuízos causados na natureza e no meio ambiente (DA CUNHA *et al.*, 2020; FARIAS *et al.*, 2012)

Desta forma, materiais provindos de fontes renováveis, como, biomateriais, filmes e recobrimentos biodegradáveis apresentam grande potencial de expansão devido a sua viabilidade econômica e técnica, além de possuírem altas taxas de reciclagem e biodegradação, favorecendo um desenvolvimento sustentável e minimizando os impactos ambientais (BARRETO *et al.*, 2020; DE AMORIN *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2017).

1.1 Filmes provenientes de fontes renováveis

O desenvolvimento de filmes e embalagens biodegradáveis a partir de polímeros provenientes de fontes renováveis tornou-se atraente devido seu processo natural de decomposição, onde os microrganismos geram enzimas que utilizam os compostos orgânicos dos biopolímeros como nutrientes (DA SILVA *et al.*, 2018; FARIAS *et al.*, 2012). Quando lançados no meio ambiente, são convertidos em compostos simples, mineralizados, que redistribuídos pelo ciclo de carbono, nitrogênio e enxofre, não agredem o biosistema (BUENO, 2019), constituindo, portanto, um processo ecologicamente amigável (DE AMORIN *et al.*, 2019).

Espera-se que esses filmes sejam biocompatíveis, não tóxicos, de baixa irritabilidade, flexíveis, elásticos e macios (KARKI *et al.*, 2016; PEREIRA *et al.*, 2014), tenham boa aceitabilidade sensorial, propriedades de barreira e mecânica adequadas, estabilidade bioquímica, físico-química e microbiológica, sejam inócuos, não poluentes, de baixo custo e de fácil processamento, de preferência transparentes, além de boa aderência e que sejam de fácil remoção (BUENO, 2019).

Geralmente, os materiais para a sua elaboração são as proteínas derivadas de celulose, alginato, pectina, amido e outros polissacarídeos (FARIAS *et al.*, 2019).

Sobre suas aplicabilidades, podem ser usados como embalagens comestíveis para frutas ou outros alimentos, revestimento de cosméticos, curativos, plataformas de liberação controlada de medicamentos no local da lesão, bem como para a administração de medicamentos de ação sistêmica e local, por via oral, bucal, sublingual, ocular e transdérmica, dentre outros (BUENO, 2019; BARROS, 2016; KARKI *et al.*, 2016).

Os purês de frutas por terem em sua composição substâncias pécticas e celulósicas, apresentam capacidade de agregação e interação entre seus compostos, com propriedades filmogênicas que resultam em matrizes nos quais os próprios açúcares atuam como plastificantes naturais (BARROS, 2016) e por possuírem quantidade significativa de fibras contribuem como aditivo para reforço mecânico e térmico, além de desempenharem ações biológicas/farmacológicas, como por exemplo, atividade antioxidante (DANTAS *et al.*, 2015).

Além disso, pensando em sustentabilidade, as frutas são matérias orgânicas que geram grande quantidade de resíduos, já que nem todas as suas partes são consumidas e quando passam do estágio de maturação acabam sendo descartadas, pois se tornam impróprias para o consumo. Assim, além da grande disponibilidade de matéria prima, o uso de filmes biodegradáveis a partir do purê de frutas é uma alternativa atrativa e interessante para minimizar o descarte de resíduos no meio ambiente (BARROS, 2016).

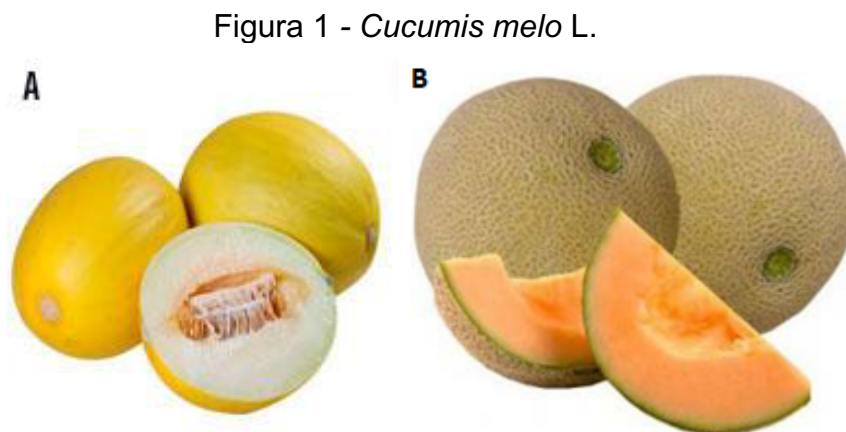
Ademais, os produtos naturais de um modo geral são estudados há muitos anos e utilizados para o desenvolvimento de formulações em áreas médicas e farmacêuticas, devido aos seus fitoquímicos, compostos bioativos, como alcaloides, terpenóides, taninos, esteroides e flavonoides, que resultam em diversas propriedades terapêuticas (OSINUBI *et al.*, 2020; OGADNIMA *et al.*, 2019; MESSAOUDI *et al.*, 2019).

1.2 *Cucumis melo* L. (melão)

A família Cucurbitaceae, compreende várias espécies de plantas como a melancia (*Citrullus lanatus* Thunb), as abóboras (*Cucurbita máxima* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.) e melão (*Cucumis melo* L.) (EZZAT *et al.*, 2019).

O melão (Figura 1) é umas das frutas frescas mais consumidas e exportadas em todo mundo, devido aos seus aromas finos, benefícios nutricionais, além de ser uma das espécies com maior diversidade do gênero *Cucumis* e apresentar extensa variação fenotípica e genotípica, agregando um grande valor econômico (FARCUH *et al.*, 2020, EZZAT *et al.*, 2019; ROLIM *et al.*, 2018). Teve sua origem na África e se espalhou para Índia e outras regiões do mundo de clima temperado como Europa e Ásia, e em várias regiões do mundo por se adaptar a diferentes solos e climas (MALLEK-AYADI *et al.*, 2018; ROLIM *et al.*, 2018; SANTOS, 2016).

O Brasil tem uma área de aproximadamente 17,5 mil hectares para o cultivo, sendo o sexto maior exportador do mundo (ROLIM *et al.*, 2018), onde 70% dos melões produzidos são do tipo amarelo (Figura 1A), pertencente ao grupo botânico *Inodorus* e os 30% restante são de melões considerados nobres como os rendilhados e reticulados (Figura 1B) (GUIMARÃES *et al.*, 2020).



Fonte. Pretti; Raju, 2017

C. melo L. é uma planta anual, herbácea, escalada ou rastejante, com caule angular e escabroso, as folhas são alternadas e simples e as flores unissexuais e amarelas. As diversas variedades de melão mostram diversidade na folhagem, no tamanho e formato da fruta, coloração, casca lisa ou enrugada, com nervura ou sulcada. A polpa pode ser branca, verde ou laranja, perfumada ou sem cheiro, doce

ou insípida (PRETTI; RAJU, 2017; MULLER *et al.*, 2013). É rico em proteínas, carboidratos, fibras, ácido cítrico, vitamina K e A, folato, cucurbitacina β , lítio e zinco, β -caroteno, lentina, xantina e criptoxantina (ITTIYAVIRAH *et al.*, 2014), ácido 3,4,5 trihidroxibenzóico (ácido gálico), ácido elágico, ácido salicílico, catequinas, eugenol, quercetina e ácido vanílico (WANG *et al.*, 2020).

De acordo com Rolim *et al.* (2018), o ácido gálico é o principal componente do extrato aquoso das cascas de melão, seguido por apigenina-7- glicosídeo. Neste estudo também foram identificados ácido salicílico, ácido elágico, catequina, quercetina, vanilina, eugenol e ácido vanílico.

Nas folhas, foram encontrados melosídeo A, melosídeo L e seis ésteres de cafeína, no caule cucurbitacina B e E e nos frutos, ácido ferúlico, cafeico e clorogênico, urease, peptase, protease, vitamina A, B, C, além de curcumina e leptodermina. O extrato etanólico do fruto contém uma saponina identificada como estigmasta-7-16-25 (26) trieno-3-O- β -D-glucopiranosil (15)O-p-Dxilofuranosídeo (PRETTI; RAJU, 2017).

Baseado nos seus fitoquímicos, possui atividade biológica variada como ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-diabetes, anticolesterol (GANJI *et al.*, 2019), antimicrobiana e anticâncer (WANG *et al.*, 2020), além de combater a depressão, caspa, úlceras, doenças cardiovasculares e estimular o sistema imunológico. Na medicina Urani e tradicional, é utilizado para inflamações do fígado, tosse, eczema, distúrbios renais, câncer, distúrbios vasculares e derrames (EZZAT *et al.*, 2019; MALLEK-AYADY *et al.*, 2018, ITTIYAVIRAH *et al.*, 2013).

1.3 *Citrullus lanatus* Thunb (melancia)

A melancia, *Citrullus lanatus* (Thunb) Matsun e Nakai (Figura 2), também pertencente à família Cucurbitaceae, é encontrada em todas as províncias da África do Sul e cultivada globalmente em partes mais quentes, incluindo a África Mediterrânea, Oriente Médio, Oeste da Ásia, China, Japão e América (KOMANE *et al.*, 2017). Foi trazida para o Brasil pelos espanhóis durante o ciclo da cana-de-açúcar, tornando-se muito popular (COSTA, 2017).

Citrullus vem de uma palavra grega “citrus” e é uma referência a fruta e *lanatus* é latina, tem o significado de ser lanosa, referindo-se aos pequenos pelos nas hastes e folhas da planta (ERHIRHIE *et al.*, 2013). É consumida basicamente in natura ou na forma de sucos, geléias, doces, molhos, em saladas, representando um importante papel na alimentação, especialmente em regiões tropicais, sendo a terceira fruta

popular mais consumida no mundo, devido a sua capacidade refrescante, cor e sabor atraente (MAOTO *et al.*, 2019; COSTA *et al.*, 2017), além de possuir mais de 91% de água, 7% de carboidratos e ser rica em citrulina, licopeno, potássio e vitaminas essenciais (MINH *et al.*, 2019).

Figura 2 - *Citrullus lanatus* (Thunb)



Fonte. saude.ccm.net

C. lanatus é uma planta herbácea de ciclo vegetativo anual, prostada, com várias hastes herbáceas e robustas de até 3 m de comprimento. As partes jovens são densas e lanosas, com pelos que variam do amarelo ao marrom, enquanto as partes mais velhas não possuem pelos. As folhas são herbáceas, rígidas, ásperas de ambos os lados, de 60 a 200 mm de comprimento e 40 a 50 mm de largura, com 3 lóbulos profundos. Os caules são peludos e tem até 150 mm de comprimento. São monóicas, apresentando flores masculinas e femininas, verdes por dentro e amarelas por fora (Figura 3). O fruto na forma silvestre é subgloboso, de 6 a 20 cm de diâmetro com coloração verde escura, enquanto a polpa é rosa avermelhada com sementes marrom escuras (KOMANE *et al.*, 2017; ERHIRHIE *et al.*, 2013).

Figura 3 - Partes aéreas de *Citrullus lanatus*

Fonte. Ferrari, 2013

Na medicina popular e indígena, por conter compostos como cucurbitacina, triterpenos, esteróis, alcaloides, vitaminas e minerais é utilizada como purgativo, emético, vermífugo, demulcente, diurético, tônico e anti-hipertensivo (ERHIRHIE *et al.*, 2013). De acordo com Nasiru e Oluwasegun (2019), auxilia no tratamento da asma, aterosclerose, diabetes, câncer de colon e artrite.

Os frutos da melancia apresentam carotenoides (licopeno e β -caroteno) que são responsáveis pelas cores da polpa (CHOUDHARY *et al.*, 2015). É fonte de vitaminas (A, B, C e E), minerais (fósforo, magnésio, cálcio, potássio e ferro), aminoácidos específicos (citrulina e arginina) (MAOTO *et al.*, 2019; JAYAPRAKASHA *et al.*, 2016; TLILI *et al.*, 2011), além de compostos fenólicos derivados do ácido hidroxicinâmico (COSTA *et al.*, 2017).

Sobre as propriedades de algumas das suas substâncias, o potássio, por exemplo, é um importante componente de fluídos corporais, que auxilia na frequência cardíaca e pressão arterial, prevenindo derrames e doenças coronarianas (MINH *et al.*, 2019).

O β -caroteno não pode ser sintetizado pelo organismo, portanto é obtido por meio dos alimentos. É visível na cor laranja nas frutas e legumes e serve como um precursor para a vitamina A, essencial para a visão, para manter a integridade dos tecidos epiteliais, bom funcionamento do sistema imunológico, além de agir como fator de crescimento para células epiteliais e intensificar a agregação plaquetária, levando a reconstrução da parede dos vasos (CHOUDHARY *et al.*, 2015; MAOTO *et al.*, 2019).

A vitamina C é um nutriente essencial que também não pode ser sintetizado pelo corpo humano. A melancia é uma fonte de vitamina C, sendo que uma xícara de suco de melancia possui 20% do valor diário. É classificada como antioxidante de quebra de cadeia, interferindo na etapa de propagação radicalar, inibindo a peroxidação lipídica (MAOTO *et al.*, 2019; CARDOSO, 1997).

O licopeno possui propriedades antioxidantes, é útil na prevenção de doenças cardiovasculares, certos tipos de câncer e pode proteger a pele contra os efeitos nocivos da radiação ultravioleta (CHOUDHARY *et al.*, 2015). De acordo com Hartman *et al.* (2019), o licopeno reduz o crescimento de células tumorais e induz a morte de células cancerígenas de leucemia, mama, endométrio, pulmão e próstata. Além disso, retarda o desenvolvimento de aterosclerose, protege contra a peroxidação lipídica e a produção de células espumosas (componentes das placas ateroscleróticas) e participam ativamente do acúmulo intracelular do colesterol (VOLOBUEVA, *et al.*, 2018).

Por fim, a L-citrulina, um aminoácido não proteico, identificado na melancia, é um precursor da arginina e intermediário metabólico no ciclo do óxido nítrico. É produzida naturalmente no corpo e absorvida pelo intestino. Como aminoácido é importante na recuperação de traumas, lesão por queimadura, ressecção maciça do intestino delgado, insuficiência renal, importante na prevenção de anemia e no relaxamento e desempenho muscular. Aumenta a vasodilatação, diminuindo a pressão sistólica e diastólica, correção da disfunção erétil e diminuição da angina vasospástica (MAOTO *et al.*, 2019; HARTMAN *et al.*, 2019; JAYAPRAKASHA *et al.*, 2016).

Considerando o alto valor nutricional e terapêutico, a produção de filmes e recobrimentos a partir dos frutos de melão e melancia, é uma proposta interessante e inovadora, no entanto, esses filmes devem ser avaliados antes de serem considerados atóxicos e seguros.

1.4 Ensaios de Toxicidade

1.4.1 Citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade *in vitro* são testes biológicos de avaliação e triagem que utiliza células de tecido para observar o crescimento e a viabilidade celular e os efeitos morfológicos induzidos pelas diferentes amostras-teste. Considerados testes simples, rápidos e altamente sensíveis, geralmente requerem um período de

incubação de um reagente com uma população de células viáveis para converter o substrato em um produto colorido ou fluorescente (RISS *et al.*, 2016; LI *et al.*, 2015).

Os ensaios colorimétricos com sais de tetrazólio (MTT) tem sido amplamente utilizado para medir a atividade celular como um indicador de viabilidade, proliferação e citotoxicidade celular. Sua metodologia se baseia na capacidade das células viáveis e com metabolismo ativo de converter o MTT (um sal amarelo e solúvel em água) em cristais de formazam (roxo e insolúvel). Os cristais de formazam produzidos são quantificados medindo a absorvância em um espectrofotômetro com comprimento de onda próximo a 570 nm (RISS *et al.*, 2017; LI *et al.*, 2015).

1.4.2. (Anti) Genotoxicidade

A avaliação da genotoxicidade é uma ferramenta importante, pois investiga a capacidade de substâncias danificarem a informação genética induzindo lesões ou mutações no DNA. As mutações podem ser induzidas por agentes físicos, químicos e biológicos e correspondem ao primeiro evento para desencadear a carcinogênese (DUTRA, 2019; REN *et al.*, 2017), além de serem capazes de iniciar uma variedade de doenças crônico-degenerativas, como inflamação, diabetes, distúrbios hepáticos, cardiovasculares e neurológicos, artrite e envelhecimento, entre outros (MALIK *et al.*, 2021). Portanto, uma forma de prevenir doenças genéticas em humanos está na busca de agentes que tenham a capacidade de neutralizar os efeitos mutagênicos (LIM, LEE, 2020).

Os antimutagênicos são compostos de grande interesse no campo da quimioprevenção (COCCHI *et al.*, 2020), e podem inativar os mutágenos antes que atinjam o DNA (desmutágenos) ou agirem dentro da célula e participarem da supressão da mutação após o DNA ter sido danificado (bioantimutágenos) (SLOCZYNSKA *et al.*, 2014).

Tão importante quanto a busca de compostos antimutagênicos, está a identificação de agentes mutagênicos. Os ensaios genotóxicos são requisitos iniciais de segurança para o desenvolvimento de novos fármacos e outros produtos farmacêuticos (LOPES, 2019), produtos de uso diário, venenos, entre outros (SOMMER *et al.*, 2020).

Dentre os ensaios que podem ser usados, destacam-se o teste de Ames (*Salmonella*/microsoma) e o ensaio do Micronúcleo (MN), que detectam mutações gênicas e cromossômicas, respectivamente.

O teste de Ames é usado na triagem inicial para identificar substâncias puras, na mistura e em amostras ambientais, que podem produzir danos genéticos causando mutações gênicas/ pontuais (OECD, 2020). Além disso, tem sido amplamente utilizado em estudos para elucidar mecanismos de mutagênese e na identificação de agentes antimutagênicos (UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Esse teste é baseado na indução de mutações reversas utilizando cepas de *Salmonella* Typhimurium, derivadas da parental Lt2, auxotróficas ao aminoácido histidina (His-). As linhagens bacterianas apresentam diferentes mutações no operon desse aminoácido e foram construídas para detectar mutações como *frameshift* (TA97a, TA98) ou substituição de pares de base de DNA (TA100 - mutações de pares de base Guanina-Citosina (GC) e TA102 - mutações de pares de base Adenina-Timina (AT)). Incapazes de crescer em meio de cultura mínimo, sem histidina, essas cepas quando sofrem novas mutações no local das mutações pré-existentes ou próximo aos genes que restauram sua função, o número de revertentes pode ser medido pela contagem de colônias. Por isso, é conhecido como teste de reversão (MORTELMANS; ZEIGER, 2000; UMBUZEIRO; VARGAS, 2003).

Além disso, como a bactéria não tem capacidade metabólica, um sistema de ativação exógena de mamíferos é adicionado, ou seja, são utilizadas enzimas hepáticas de rato ou hamster, denominadas fração microsossomal S9, para promover a conversão metabólica da amostra-teste (BARBEZAN *et al.*, 2017; REN *et al.*, 2017; MARON; AMES, 1983).

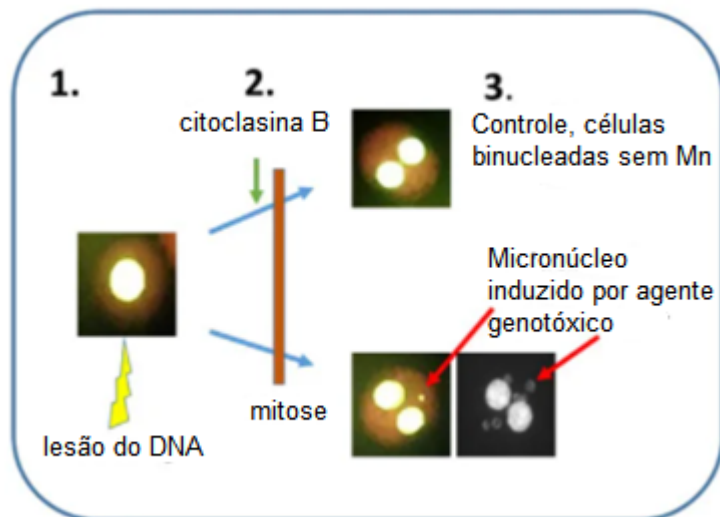
Já o ensaio do MN com bloqueio da citocinese pode ser usado para medir danos ao DNA, citostase e citotoxicidade (FENECH, 2007). É um teste validado pela “*Organisation for Economic Co-operation and Development*” OECD (OECD 2016) e considerado um biomarcador para agentes clastogênicos, aqueles que causam perda ou rearranjos de segmentos cromossômicos, e aneugênicos (aneuploidia), os que dão origem a uma mudança (ganho ou perda) no número de cromossomos das células (EFSA, 2021).

Os danos ao DNA são pontuados em células binucleadas (BNs) micronucleadas resultantes da quebra cromossômica ou perda de cromossomos inteiros, enquanto os efeitos citostáticos são medidos pela proporção de células mono, bi e multinucleadas (FENECH, 2007).

Os MNs representam danos que foram transmitidos para células filhas (DOHERTY, 2011) e são pequenos corpos arredondados que contém cromatina

visível no citoplasma das células (SOMMER *et al.*, 2020). Nesse ensaio, as células que completaram uma divisão nuclear são impedidas de realizar a citocinese, devido a adição de citoclasina B, que inibe a polimerização dos filamentos de actina e a formação de microfilamentos contráteis. Como a cariocinese não é interrompida, células BNs são formadas e os MNs são visíveis em seu citoplasma (SOMMER *et al.*, 2020; FENECH, 2000).

Figura 4 - Princípio do ensaio de micronúcleo com bloqueio de citocinese. 1. Núcleo com DNA danificado. 2. Inibição de citocinese pela adição de citocalasina B. 3. A frequência de MN é pontuada apenas em células binucleadas. Parte superior - células binucleadas de controle sem MN, parte inferior – duas células binucleadas com 1 ou 6 MN visíveis no citoplasma.



Fonte: Adaptado de SOMMER *et al.*, 2020

Considerando que os testes de Ames e MN *in vitro* detectam dois pontos genéticos principais, isto é, mutações gênicas e cromossômicas, respectivamente, são apropriados em uma bateria de testes de toxicologia genética para prever potenciais riscos humanos (EFSA, 2011).

1.5 Atividade antioxidante

Essencial para a vida, o oxigênio (O_2), produz a energia necessária para o funcionamento celular por meio dos processos de oxidação. No entanto, esses processos resultam em várias espécies reativas de oxigênio (EROs) (GAUTAN *et al.*, 2020), como por exemplo, o ânion superóxido ($O_2^{\cdot-}$), radical hidroxila (OH), óxido

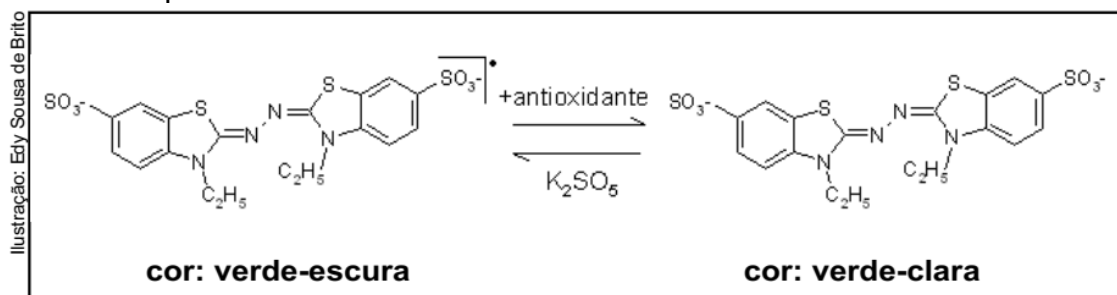
nítrico (ON), peróxido de hidrogênio (H₂O₂), radical Lipídico (L[•]), entre outros (RUFINO *et al.*, 2007), que são subprodutos do metabolismo celular normal (GOLWALA *et al.*, 2020), mas que podem levar a danos celulares significativos pela oxidação e peroxidação de estruturas celulares como ácidos nucleicos, lipídios, carboidratos e proteínas, o que pode ocasionar processos patológicos como envelhecimento, câncer, aterosclerose, doenças cardíacas, neurodegenerativas, artrite reumatoide, entre outros (GAUTAN *et al.*, 2020; GOLWALA *et al.*, 2020).

Os efeitos nocivos do estresse oxidativo podem ser neutralizados por agentes antioxidantes, que capturam as EROs ou que ativam enzimas antioxidantes para prevenir os danos induzidos por eles (BOUAZIS *et al.*, 2020).

Frutas e vegetais são descritos como uma fonte de fitoquímicos (OSINUBI *et al.*, 2020), que podem modular o metabolismo celular e a expressão de enzimas antioxidantes, afetando a integridade e o status redox das células (BRONDANI *et al.*, 2020). Exemplos de antioxidantes hidrofílicos de frutas e vegetais são ácido ascórbico e fenólicos, e antioxidantes lipofílicos os carotenóides (RUFINO *et al.*, 2007).

Um dos métodos utilizados para medir a atividade antioxidante é pela captura do radical 2,2'-azinobis (3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico), ABTS^{•+} (Figura 5), gerado por uma reação química, eletroquímica e enzimática, que é capaz de avaliar a atividade de compostos de natureza hidrofílica e lipofílica. Quando essa redução ocorre, há uma mudança na cor do meio de verde escuro para verde claro (RUFINO *et al.*, 2007).

Figura 5 - Estabilização do radical (ABTS^{•+}) por um antioxidante e sua formação pelo persulfato de potássio.



Fonte: Rufino *et al.*, 2007

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade citotóxica, antiproliferativa, mutagênica, antimutagênica e antioxidante de filmes poliméricos de melão e melancia, para aplicação em diversos setores da indústria.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a citotoxicidade e a atividade antiproliferativa dos filmes de melão e melancia (lavados e não lavados) pelo ensaio do MTT, utilizando células não tumorais - fibroblastos de pulmão humano (GM-07492A) e uma linhagem de células com perfil metabólico - carcinoma hepatocelular humano (HepG2), em diferentes tempos de tratamento (4, 24, 48 e 72 horas);
- Avaliar a mutagenicidade dos filmes de melão e melancia (lavados e não lavados) pelo teste de Ames, utilizando diferentes cepas de *S. Typhimurium* (TA98, TA100, TA 97a e TA102), em experimentos com e sem ativação metabólica;
- Avaliar a mutagenicidade dos filmes de melão e melancia (lavados e não lavados) pelo ensaio do MN utilizando células de ovário de hamster chinês (CHO-K1) com 4 horas de tratamento e células HepG2 com 24 horas de tratamento;
- Avaliar a antimutagenicidade dos filmes de melão e melancia (lavados e não lavados) frente ao mutágeno benzo[a]pireno (B[a]P), pelo teste de Ames, na linhagem TA98 de *S. Typhimurium*, em experimentos com ativação metabólica;
- Avaliar a atividade antioxidante dos filmes de melão e melancia (lavados e não lavados) por meio do ensaio ABTS^{•+}.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das Amostras

Os filmes de melão e melancia (Figura 6) foram produzidos e fornecidos pelo Dr. Diógenes dos Santos Dias da empresa BioSmart Nanotechnology.

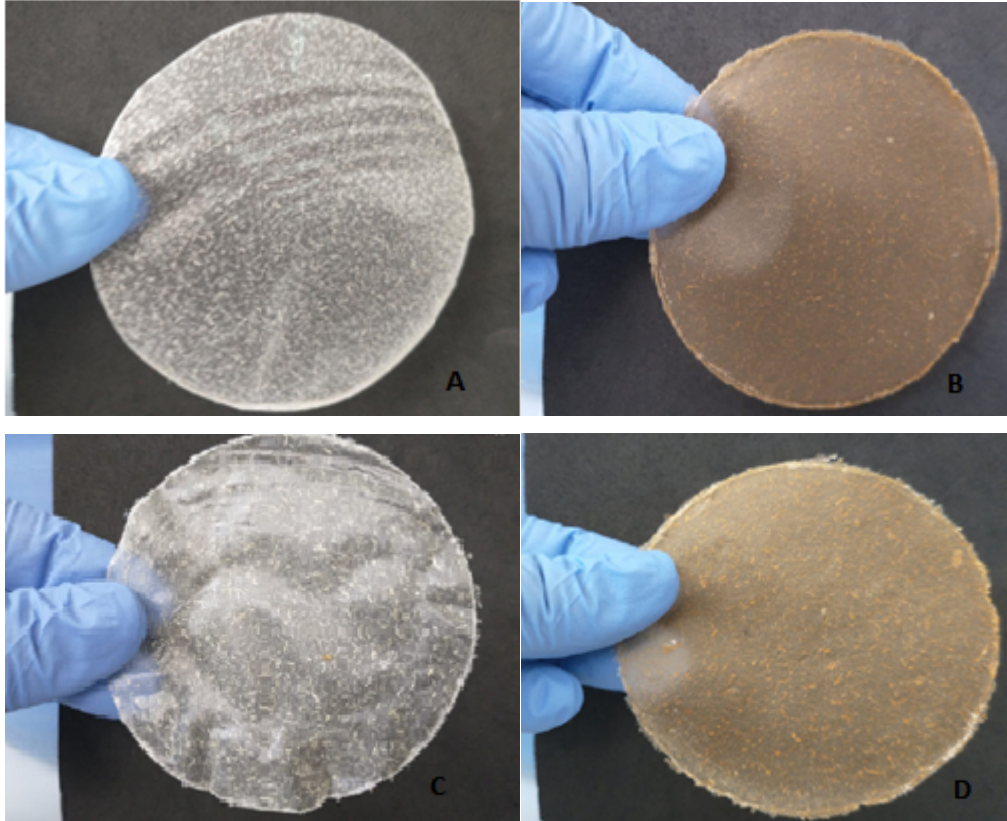
As frutas (melão e melancia) adquiridas na cidade de Araraquara, São Paulo, Brasil, foram lavadas para retirar os detritos das cascas e fatiadas em oito partes no sentido longitudinal. As fatias foram separadas com uma faca em endocarpo (polpa consumível in natura), mesocarpo (polpa branca) e epicarpo (casca verde/ amarela).

O mesocarpo foi cortado em cubos e adicionados em panela de pressão elétrica sem água, por 20 minutos. Após o resfriamento, o mesocarpo foi triturado em liquidificador por 5 minutos e passado em peneira de 1 mm para reter possíveis partículas que não sofreram modificação durante o tratamento hidrotérmico. O purê processado foi separado em duas amostras e nomeados como: lavados (L) e não lavados (NL).

A amostra não lavada foi adicionada diretamente na placa de Petri de vidro com um círculo de teflon para evitar a colagem sobre o fundo e levada para secar em capela elétrica com ventilação por aproximadamente seis horas ou até o descolamento do filme da base de secagem.

A amostra lavada foi adicionada sobre papel de filtro de filtragem rápida e lavada com água destilada até a liberação de água de lavagem clara e sem sabor ou odor. Após a lavagem foi realizado o mesmo procedimento da amostra não lavada. Para melhor espalhamento do purê sobre a base de secagem foi preparada suspensão filmogênica de 2% de massa seca para o purê não lavado e 1% para o lavado.

Figura 6 - A. Filme de melão lavado B. Filme de melão não lavado C. Filme de melancia lavado D. Filme de melancia não lavado



Fonte: próprio autor

3.2 Preparação dos Eluatos

Os eluatos foram preparados como recomendado pela ISO 10993-12 (2020).

A proporção utilizada para a avaliação da citotoxicidade foi um filme com 6 cm² em 1 mL de meio de cultura DMEM (*Dulbecco's modification of Eagle's medium* - Sigma – Aldrich) com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF - Gibco), constituindo o chamado “meio de cultura completo”, mantidos por 24 horas a 37°C, sob agitação.

Para a avaliação da mutagenicidade, a preparação das amostras seguiu o mesmo padrão, no entanto, para o teste de Ames, foi utilizado como veículo o dimetilsulfóxido (DMSO) e para o ensaio do MN, meio de cultura completo, mantidos por 72 horas a 37°C, sob agitação.

Para os testes de antimutagenicidade, a fim de manter a mesma proporção utilizada nos tratamentos dos testes de mutagenicidade (teste de Ames) e como o solvente (DMSO) não pode ser usado em um volume superior de 100 µL, pois pode induzir toxicidade nas linhagens de *S. Typhimurium*, dois filmes (6 cm²/ cada) foram mantidos em 1 mL de DMSO e incubados a 72 horas a 37°C, sob agitação.

As médias das massas correspondentes e desvios padrões dos filmes foram: $0,02 \pm 0,01$ g de filme de melancia lavado e $0,1 \pm 0,002$ g do filme não lavado, enquanto que de melão foi $0,03 \pm 0,002$ g do filme lavado e $0,15 \pm 0,001$ g do filme não lavado.

Para o ensaio de atividade antioxidante, a solução estoque das amostras foram preparadas na concentração de 3000 ppm utilizando H₂O MiliQ. Essa solução foi mantida por 24 horas no escuro e, após este período, foi filtrada.

3.3 Linhagens celulares e condições de cultivo

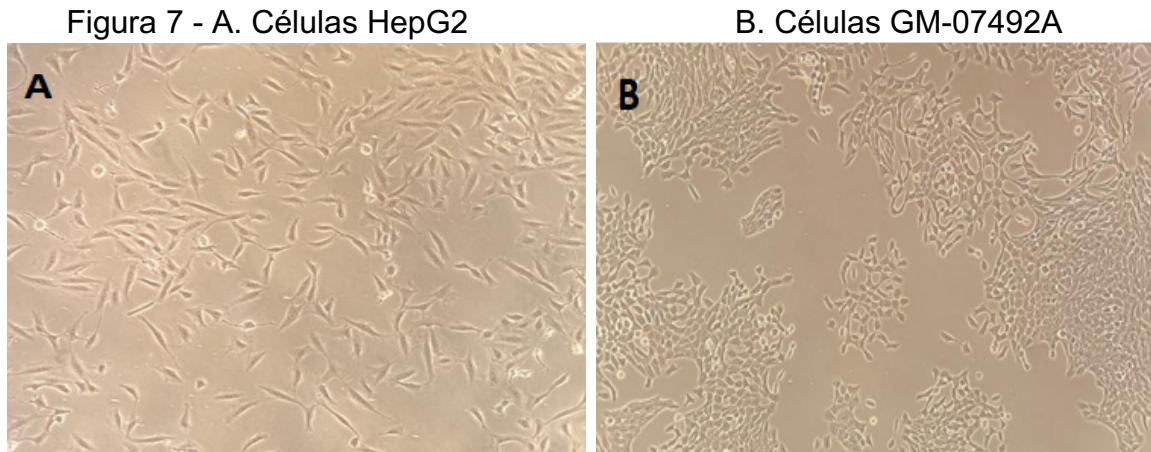
As linhagens celulares utilizadas nesse trabalho foram HepG2 (ATCC® HB-8065™), GM 07492A (CVCL 7467 NIGMS) (Figura 7) e CHO-K1 (ATCC® CCL-61™) (Figura 8). As células foram mantidas em monocamada em frascos de cultura de 25 ou 75 cm² (Corning) a 37°C em atmosfera de 5% de dióxido de carbono (CO₂) e 95% de ar sob umidade saturada e cultivadas em meio de cultura completo.

Até o momento do uso, as linhagens foram mantidas congeladas (-80°C) em tubos criogênicos contendo SBF e 5% de DMSO.

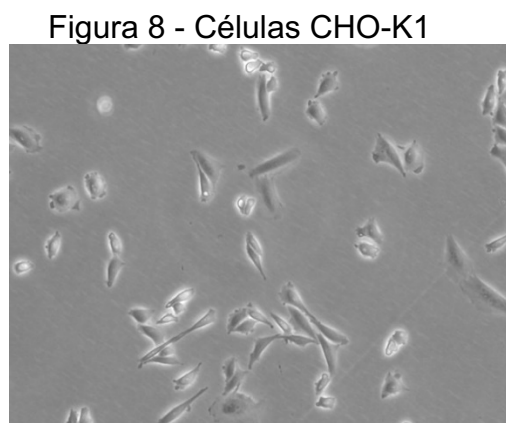
Para o descongelamento das células, o vial criogênico permaneceu em temperatura ambiente até seu completo descongelamento. Após isso, o conteúdo foi colocado em tubo de centrifuga estéril (15 mL) contendo 2 mL de meio de cultura completo e submetido a centrifugação por 4 min a 1500 rpm. O sobrenadante foi descartado e ao *pellet* foi acrescentado 2 mL do meio. A suspensão celular foi transferida para uma nova garrafa de cultivo, a qual foi incubada nas condições previamente descritas até atingir aproximadamente 80% da confluência celular.

Para a tripsinização, após a remoção do meio de cultura, as células foram lavadas com *Phosphate Buffered Saline* (PBS) e desprendidas da superfície interna do frasco de cultura utilizando a tripsina (Gibco-Invitrogen). Após o desprendimento das células, 2 mL de meio de cultura completo foram adicionados ao frasco para inativação da tripsina e homogeneizado. Uma pequena quantidade de células foi colocada em cultivo em novos frascos de cultura contendo 5 mL de meio de cultura completo, e submetida as condições padronizadas de incubação até a preparação da próxima subcultura.

Os experimentos foram realizados a partir da terceira passagem (subcultivo), dando prioridade para a realização dos testes em um intervalo de até 10 passagens.



Fonte: próprio autor



Fonte: Sigma-Aldrich

3.4 Avaliação da Citotoxicidade

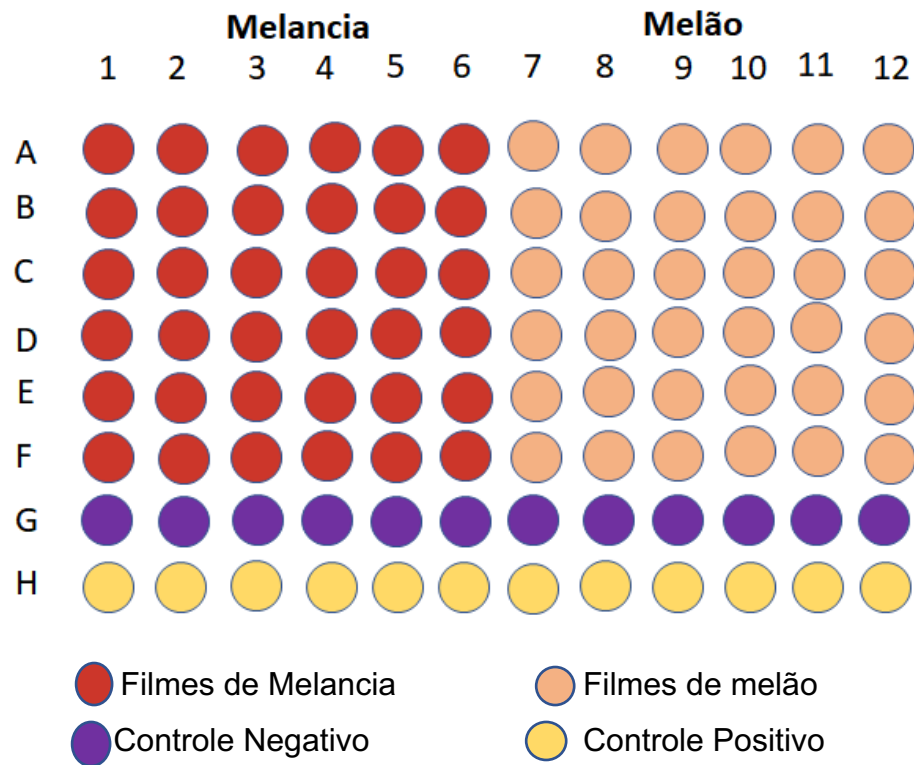
A citotoxicidade foi avaliada pelo ensaio MTT utilizando como substância reveladora o sal de tetrazólio, de acordo com o protocolo descrito por Mosman *et al.* (1983) com algumas modificações. Para realização do teste, as células GM-07492A e HepG2 foram semeadas em microplacas de 96 poços a uma densidade de $1,5 \times 10^4$ células/poço, seguido de incubação por 24 horas para adesão celular.

Para os tratamentos, os eluatos obtidos conforme descrito no Item 3.2 foram considerados 100% e as diluições seriadas foram realizadas diretamente nas placas de 96 poços. As concentrações variaram de 6,25% a 100% e foram avaliadas em 4, 24, 48 e 72 horas de tratamento.

Também foram incluídos os controles negativos (meio de cultura completo) e positivo (DMSO 50%). Todos os tratamentos foram realizados em sextuplicata e em

três experimentos independentes. A Figura 9 representa o esquema de tratamento realizado.

Figura 9 - Esquema de plaqueamento dos filmes de melancia e melão



Fonte: próprio autor

Após o período de tratamento, o meio de cultura foi removido, as células foram lavadas com solução de PBS e 50 μ L da solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados em cada poço, seguido por incubação de 4 horas. Após este tempo, 100 μ L de 2-propanol (SIGMA-Aldrich) foram adicionados para solubilizar os cristais de MTT-formazan formados. A absorvância foi medida em 570 nm (Polaris®).

Os resultados obtidos foram expressos como uma porcentagem do controle negativo que foi considerado 100% de viabilidade celular.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo software GraphPad Prism 9, utilizando análise de variância One-way, para determinar as significâncias estatísticas, seguido pelo teste de Tukey considerando $p < 0,05$.

3.5 Avaliação da Mutagenicidade

3.5.1 Teste de Ames

A mutagenicidade pelo teste de Ames foi avaliada de acordo com a metodologia de pré-incubação, desenvolvida por Maron; Ames (1983). Foram utilizadas as linhagens TA98, TA100, TA102 e TA97a de *S. Typhimurium*, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Com auxílio de alça de inoculação, pequena quantidade da cultura estoque congelada foi semeada em 30 mL de caldo nutriente (Oxoid nº 2), incubada a 37°C, por 14-16 horas, em shaker incubador (37°C – 100 rpm), de modo a obter uma densidade de $1-2 \times 10^9$ bactérias/mL.

Aos volumes dos eluatos dos filmes de melão e melancia (12,5 a 100 µL) foram adicionados 0,5 mL de 0,2 M de tampão fosfato ou 0,5 mL de 4% de mistura S9 e 0,1 mL de cultura de bactérias, e então incubados a 37°C por 20 - 30 minutos.

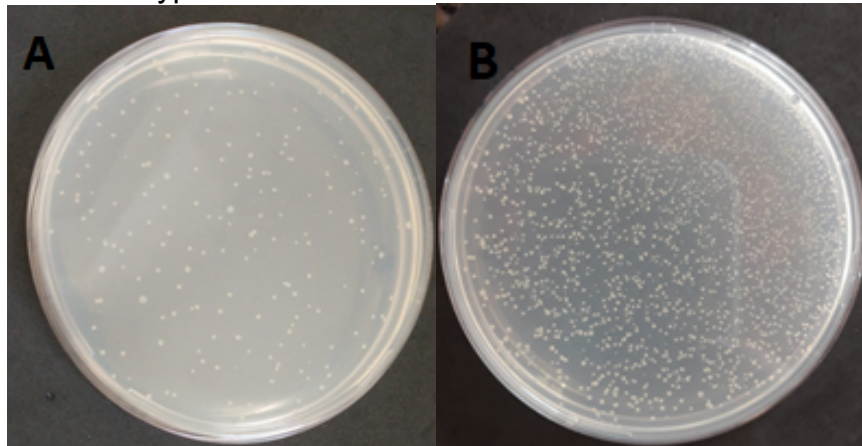
A fração microssomal S9, um homogeneizado de fígado de rato Sprague Dawley, foi adquirida sob a forma liofilizada da Molttox Molecular Toxicology Inc., Boone, USA. A fração S9 revela se a substância ou amostra necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consistiu de 4% de fração S9, 1% de 0,4 M de cloreto de magnésio, 1% de 1,65 M de cloreto de potássio, 0,5% de 1 M de glicose-6-fosfato e 4% de 0,1 M de b-nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato 0,1 M, além de 50% de 0,2 M de tampão fosfato pH 7,4 e 39,5% de água destilada estéril (MARON; AMES, 1983).

Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “top agar” (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina e D-biotina, foram adicionados nos tubos. O conteúdo de cada tubo foi levemente homogeneizado e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “top ágar”, as placas foram incubadas por 48 horas, a 37°C. Ao final desse período foi realizada manualmente a contagem do número de colônias revertentes por placa (Figura 10). O ensaio foi realizado em triplicata.

Os agentes mutagênicos padrões utilizados para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa em experimentos sem a mistura S9 foram 4 - nitro-o-fenilenodiamina (10 µg/ placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg/ placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg/ placa) para TA102. 2-aminoantraceno (1,25 µg/ placa) foi utilizado para TA98, TA97a e TA100 e 2-aminofluoreno (10 µg/ placa),

para TA102 nos experimentos com ativação metabólica. O controle negativo foi o DMSO (100 µL/placa), veículo utilizado na preparação dos eluatos dos filmes.

Figura 10 - A. Tratamento com DMSO; B. Tratamento com mitomicina C, ambos na linhagem TA102 de *S. Typhimurium*



Fonte: próprio autor

Os resultados foram analisados utilizando o programa estatístico Salanal (U.S. Environmental Protection Agency, Monitoring Systems Laboratory, Las Vegas, NV, versão 1.0, do Research Triangle Institute, RTP, Carolina do Norte, EUA), adotando o modelo de Bernstein *et al.* (1982). Os dados (revertentes/ placa) foram avaliados pela análise de variância (ANOVA), seguido de uma regressão linear. O índice de mutagenicidade (IM) também foi calculado para cada concentração testada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$IM = \frac{\text{número de revertentes/placa com o composto-teste (revertentes induzidas)}}{\text{Número de revertentes/placa com o controle (solvente) negativo}}$$

A amostra é considerada mutagênica quando tiver uma relação dose resposta entre as concentrações testadas e o número de revertentes induzidos e/ ou quando o IM for maior ou igual a dois em pelo menos uma das concentrações testadas (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

3.5.2 Ensaio do micronúcleo

O ensaio do MN foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Fenech (2007), com algumas modificações, após o tratamento de 24 horas com os

eluatos dos filmes e controles experimentais nas células HepG2 e 4 horas de tratamento nas células CHO-K1.

As células foram semeadas em placas de 6 poços em uma concentração inicial de 1×10^5 células/poço e após 24 horas de incubação para adesão celular, foram tratadas. Os tratamentos corresponderam a 50, 25, 12,5 e 6,25 % dos eluatos dos filmes lavados e 12,5, 6,25 e 3,125% dos filmes não lavados, além dos controles experimentais constituídos por meio de cultura completo (controle negativo), aflatoxina B1 (5 μ M, controle positivo para os experimentos com HepG2) e peróxido de hidrogênio (100 μ M, controle positivo para os experimentos com CHO-K1).

Após o período de tratamento, o meio de cultura contendo as amostras-teste foi substituído por um novo meio de cultura (sem qualquer tratamento), e então adicionado a cada poço 20 μ L de citoclasina B (3,0 μ g/mL), a fim de interromper a citocinese. As células foram incubadas por mais um ciclo e meio de divisão celular nas mesmas condições.

Após esse período, as células foram tripsinizadas e centrifugadas a 900 rpm por 5 minutos. O sedimento celular foi ressuscitado e homogeneizado com 3 mL de solução hipotônica gelada (cloreto de potássio, KCl 0,075M, Sigma) e essa suspensão celular foi novamente centrifugada. O sedimento, dessa vez, foi ressuscitado em 5 mL de fixador metanol: ácido acético (3:1), por 2 vezes. Após nova centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a suspensão celular gotejada em lâminas previamente limpas e mantidas em água destilada gelada até o momento do uso.

Após a secagem das lâminas, as células foram coradas com o kit Panótico Rápido LB, lavadas com água destilada, secas à temperatura ambiente e analisadas em microscópio óptico, em objetiva de 40x.

Um total de 6000 células binucleadas viáveis foram analisadas por tratamento (2000 células/ tratamento/ repetição). Os critérios utilizados para identificação dos MNs foram baseados em Fenech (2007). Além disso, foram contadas 500 células viáveis/ repetição entre mononucleadas, binucleadas e multinucleadas (três ou mais núcleos) para calcular o índice de proliferação com bloqueio da citocinese (IPBC), que permite a avaliação de toxicidade celular ou atraso no ciclo celular por meio da determinação da proliferação celular nas culturas, de acordo com a fórmula (OECD, 2016):

$$\text{IPBC} = \frac{[(\text{n}^\circ \text{ de células mononucleadas}) + 2(\text{n}^\circ \text{ de células binucleadas}) + 3(\text{n}^\circ \text{ de células multinucleadas})]}{\text{n}^\circ \text{ total de células viáveis pontuadas}}$$

O percentual de inibição foi calculado de acordo com a fórmula:

$$\% \text{ de inibição da proliferação celular} = 100 - 100\left\{\frac{(\text{IPBC}_T - 1)}{(\text{IPBC}_C - 1)}\right\}$$

onde, IPBC_T representa o IPBC das células que receberam diferentes concentrações do tratamento com os eluatos e IPBC_C representa o IPBC das células do controle negativo.

Os dados foram analisados estatisticamente pelo software Graph Pad Prism 9.0 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) utilizando análise de variância One way ANOVA para determinar as significâncias estatísticas, seguida pelo teste de Tukey considerando $p < 0,05$. Os ensaios foram feitos em triplicata e o critério experimental foi a significância da resposta ao tratamento em relação ao controle negativo.

3.6 Avaliação da Antimutagenicidade

Antes da realização dos testes de antimutagenicidade, o potencial efeito bactericida dos tratamentos foi avaliado. Para isso, mutágeno, bactéria, fração S9 e a amostra a ser testada foram misturados em um tubo de ensaio e incubado por 20 min a 37 °C. Além disso, foram feitos o controle espontâneo (S9 + bactéria) e o controle negativo (S9 + DMSO + bactéria).

Após a incubação, o conteúdo de cada tubo foi homogeneizado em vórtex e adicionado em tubos com 9 mL de solução fisiológica estéril a fim de se obter uma diluição de 1:10. Em seguida, foi homogeneizado e 1 mL transferido para outro tubo com mesma quantidade de solução fisiológica, procedendo dessa maneira diluições seriadas até obter-se uma diluição de 1×10^{-5} . Do tubo contendo a diluição de 1×10^5 , 0,1 mL do conteúdo foi semeado com alça de Drigalsky em placas com ágar nutriente e em seguida incubado por 24 horas a 37°C.

Decorrido este período, as colônias foram contadas e calculadas as unidades formadoras de colônias (UFC)/ mL (UFC = diluição x número de colônias x 10). O

percentual de viabilidade para cada tratamento foi comparado com o número de colônias do controle negativo. As respostas foram consideradas citotóxicas quando o percentual de sobrevivência da amostra foi inferior a 60% do total observado para o controle negativo (RESENDE *et al.*, 2015; LIRA *et al.*, 2008).

Para a avaliação da antimutagenicidade, diferentes volumes dos eluatos dos filmes (6,25 a 50 µL) foram associados a 50 µL de B[a]P (20 µg/ mL de DMSO). O volume final da amostra a ser testada não ultrapassou 100 µL para evitar a toxicidade induzida pelo solvente/veículo.

Nessas associações, foram adicionados 0,5 mL da mistura S9 e 0,1 mL de cultura bacteriana, e então incubados a 37°C por 20 minutos. Em seguida, foram adicionados a mistura 2 mL de top ágar suplementado com traços de histidina e biotina. Homogeneizou-se levemente e plaqueou-se em meio mínimo glicosado. Após solidificação do top ágar, as placas foram incubadas a 37°C por 48 horas. Após esse período, as colônias revertentes foram contadas manualmente. DMSO foi utilizado como controle (solvente) negativo (100 µL/placa). O ensaio foi realizado em triplicata.

Os resultados dos ensaios de antimutagenicidade foram expressos em porcentagem de inibição, ou seja, a capacidade dos filmes para inibir a ação do mutágeno B[a]P. O cálculo da porcentagem da inibição da mutagenicidade foi realizado de acordo com seguinte fórmula:

$$\text{Percentual (\%)} \text{ de inibição} = 100 - \left[\frac{\text{n}^\circ \text{ de revertentes na placa contendo B[a]P e eluatos}}{\text{n}^\circ \text{ de revertentes na placa contendo apenas B[a]P}} \times 100 \right]$$

A ausência de efeito antimutagênico foi considerada quando um valor inferior a 25% foi obtido, um efeito moderado, quando um valor entre 25% e 40% foi obtido, e forte antimutagenicidade em valores superiores a 40% (NEIGI *et al.*, 2003; LIRA *et al.*, 2008; RESENDE *et al.*, 2014).

3.7 Ensaio de Atividade Antioxidante

A atividade antioxidante foi realizada pelo ensaio de redução do radical 2,2'azinobis(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico) (ABTS^{•+}), de acordo com RUFINO *et al.* (2007).

O radical ABTS^{•+} foi preparado a partir da reação de 5 mL da solução estoque de ABTS^{•+} (7 mM) com 88 µL da solução de persulfato de potássio (K₂SO₂, 140 mM).

A mistura foi mantida no escuro, na geladeira, por 24 horas. Em seguida, uma alíquota desta mistura foi diluída em água até obter uma absorbância de $0,70 \text{ nm} \pm 0,05 \text{ nm}$ a 734 nm .

A curva padrão para determinação da equação da reta foi construída com base nos valores de absorbância (eixo Y) versus concentração (eixo X). Para isso, foram usadas alíquotas de $30 \mu\text{L}$ das soluções do padrão trolox nas concentrações de 100, 500, 1000, 1500 e 2000 μM com $2970 \mu\text{L}$ da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A solução foi homogeneizada em um agitador de tubos e mantida por 6 minutos no escuro. Após esse período, as soluções foram submetidas a leitura espectrofotométrica a 734 nm .

O branco foi preparado seguindo o mesmo procedimento descrito acima, substituindo o padrão trolox por $30 \mu\text{L}$ de etanol e a solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$ por água.

Os eluatos foram preparados nas concentrações de 750, 1124, 1500, 2250 e 3000 ppm. Uma alíquota de $200 \mu\text{L}$ de cada solução, em triplicata, foi misturada com $1600 \mu\text{L}$ da solução do radical $\text{ABTS}^{\bullet+}$. A mistura reacional foi homogeneizada e, então incubada também por 6 minutos. Após esse período, foi realizada a leitura das absorbâncias a 734 nm .

Para o cálculo da atividade antioxidante, foi substituído na equação da reta a absorbância equivalente a $1000 \mu\text{M}$ do padrão trolox. O valor obtido para X corresponde à diluição da amostra equivalente a $1000 \mu\text{M}$ de trolox.

$$Y = -ax+b$$

Onde Y é a absorbância correspondente a $1000 \mu\text{M}$ de trolox e X é a diluição da amostra (mg/L) equivalente a $1000 \mu\text{M}$ de trolox. Os resultados são expressos em μM trolox/ g de eluato.

4. RESULTADOS

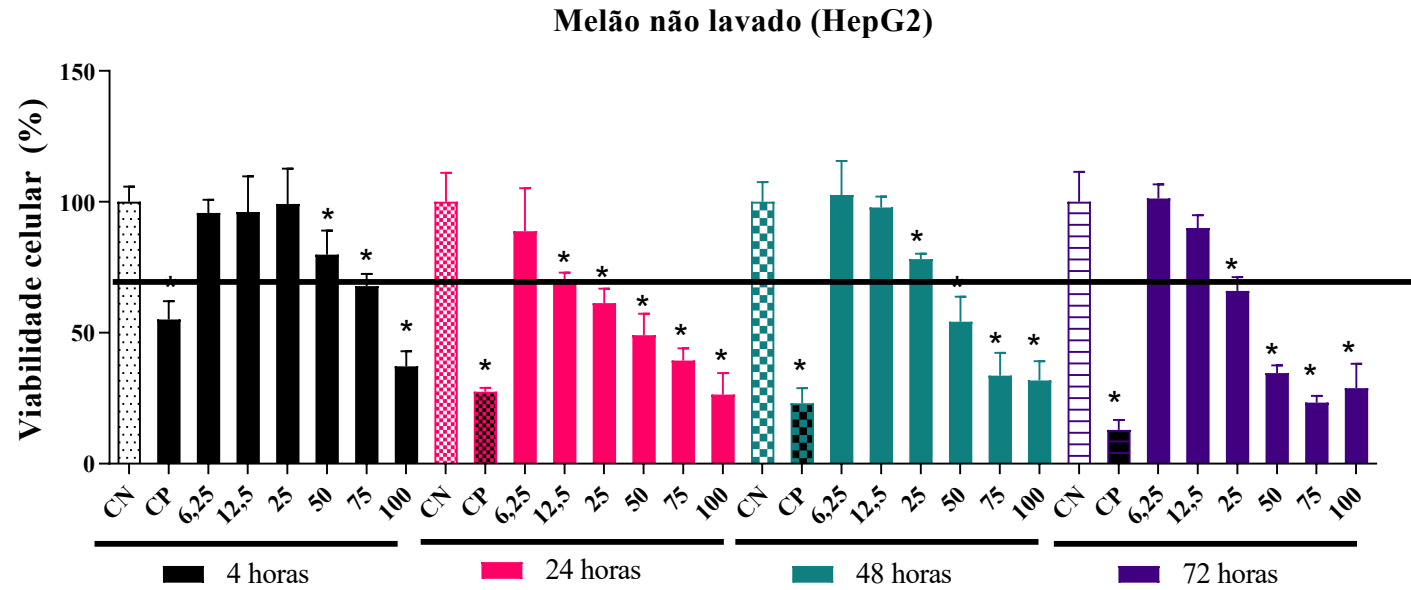
4.1 Viabilidade Celular

Os resultados da avaliação da viabilidade celular obtidos pelo ensaio MTT estão apresentados nas Figuras 11-14, expressos em porcentagem de células viáveis, para as culturas de células HepG2 e GM-07492A tratadas com as diferentes concentrações dos eluatos dos filmes de melão e melancia lavados e não lavados.

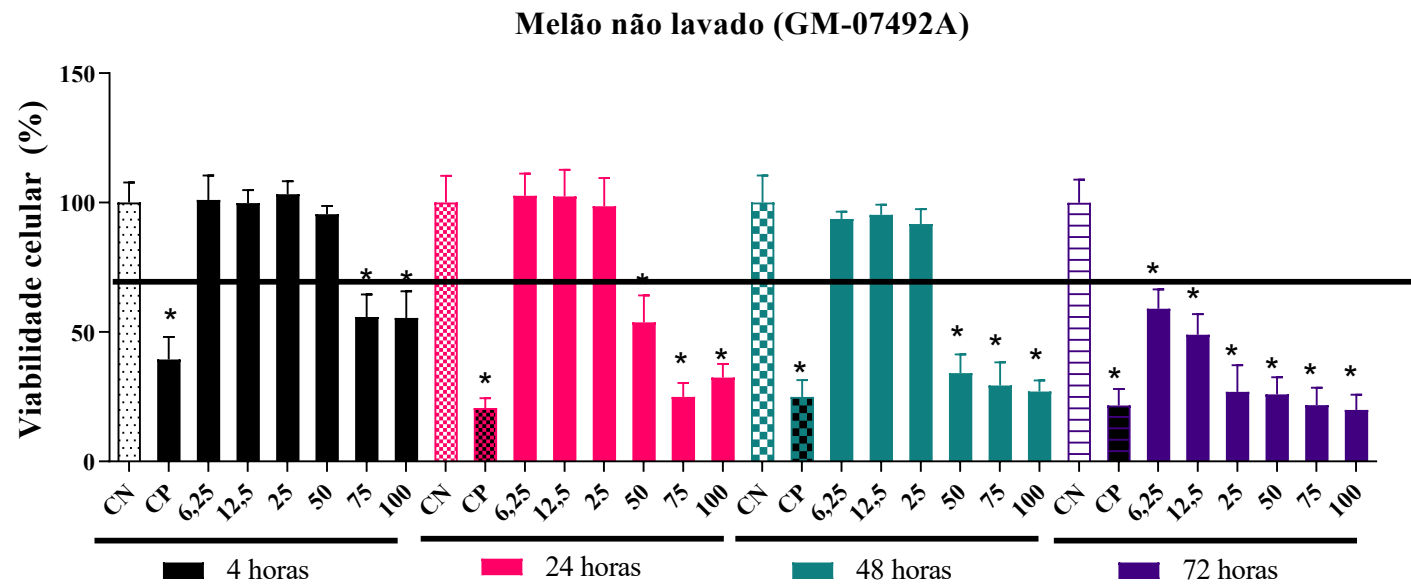
Os filmes de melão não lavado (Figura 11A) apresentaram uma redução estatisticamente significativa na porcentagem de células HepG2 comparado com o controle negativo (sem qualquer tratamento), em concentrações acima de 25% nos tempos de tratamento de 48 e 72 horas e acima de 12,5% com 24 horas de tratamento, enquanto no tempo de 4 horas, essa redução foi observada nas concentrações de 50, 75 e 100% dos eluatos.

Em GM-07492A (Figura 11B), a viabilidade celular foi reduzida estatisticamente quando comparado ao controle negativo, nas concentrações de 50, 75 e 100% nos tempos de 24 e 48 horas, apenas nas concentrações de 75 e 100% com 4 horas e em todas as concentrações com 72 horas de tratamento.

Figura 11 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 (A) e GM-07492A (B) tratadas com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes não lavados de melão



A.



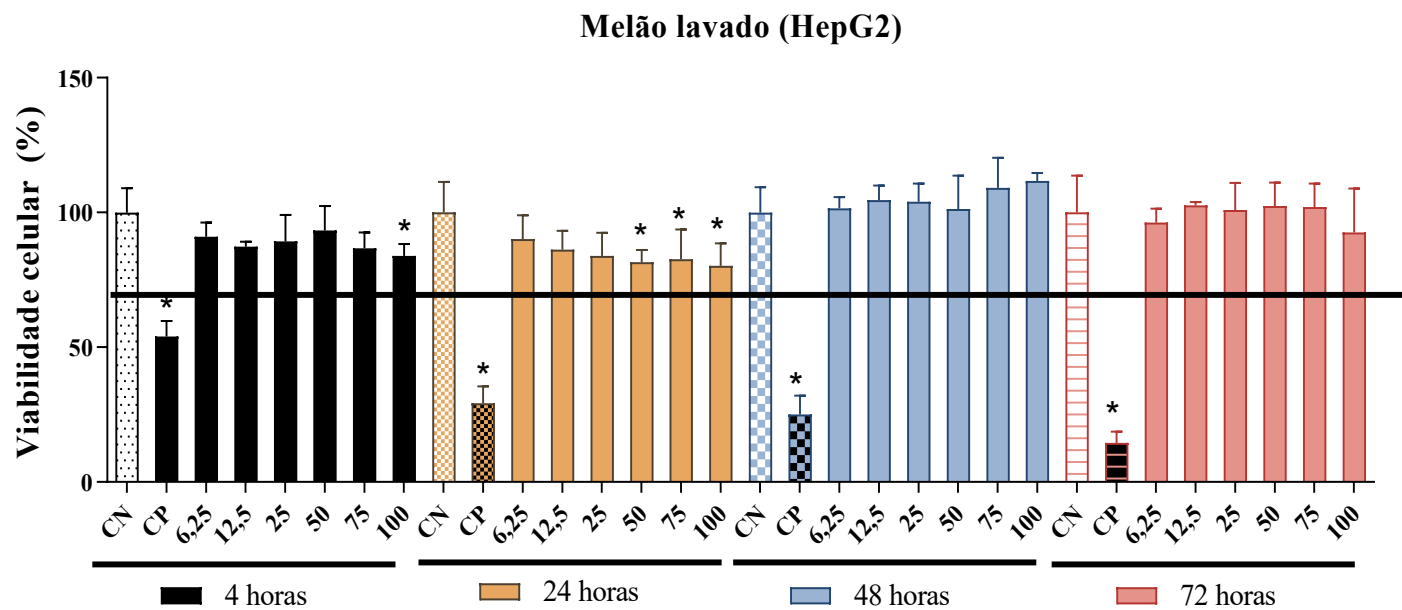
B.

CN: controle negativo (DMEM com 10% de soro bovino fetal); CP: controle positivo (DMSO 50%); Resultados obtidos de três ensaios independentes.

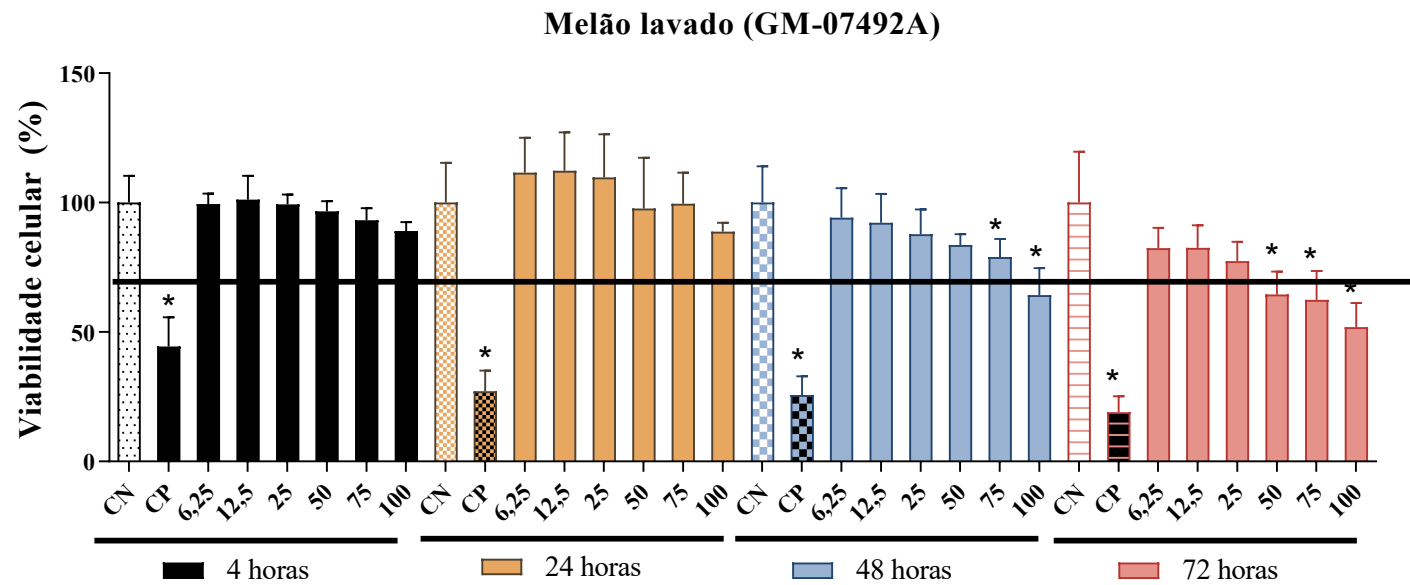
*estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

Com relação aos filmes de melão lavados (Figura 12), o efeito citotóxico foi menor comparado aos filmes não lavados. Os resultados mostraram uma redução estatisticamente significativa comparado ao controle negativo apenas nas maiores concentrações avaliadas, sendo em HepG2 (Figura 12A) nos tempos de tratamento de 4 horas (100% de eluato) e 24 horas (50, 75 e 100% de eluato) e em GM-07492A (Figura 12B) com 48 horas (75 e 100% de eluato) e 72 horas (50, 75 e 100% de eluato).

Figura 12 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 (A) e GM-07492A (B) tratadas com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes lavados de melão



A.



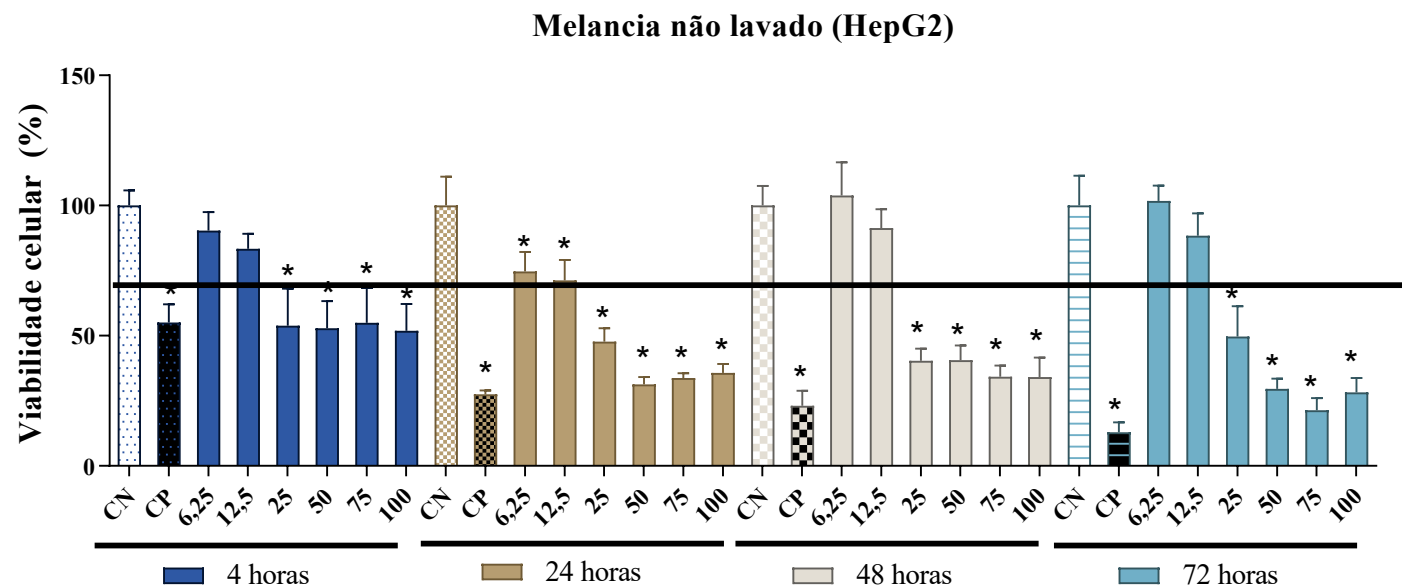
B.

CN: controle negativo (DMEM com 10% de soro bovino fetal); CP: controle positivo (DMSO 50%); Resultados obtidos de três ensaios independentes.

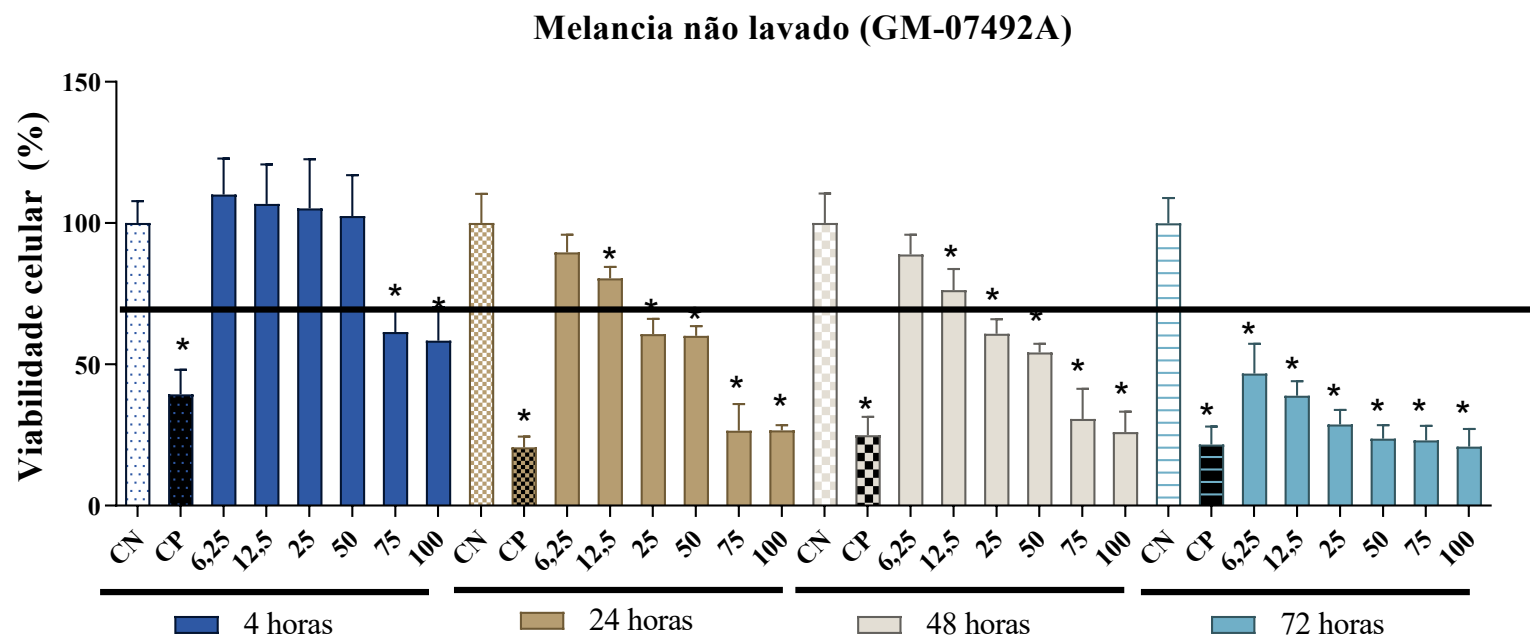
*estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

Os filmes não lavados de melancia (Figura 13) responderam de maneira semelhante aos filmes não lavados de melão. A viabilidade das células HepG2 (Figura 13A) foi reduzida de maneira estatisticamente significativa comparado ao controle negativo em concentrações acima de 25% dos eluatos nos tempos de 4, 48 e 72 horas de tratamento e em todas as concentrações com 24 horas. Já em GM-07492A (Figura 13B), essa redução foi observada com 4 horas de tratamento nas duas maiores concentrações (75 e 100%), em concentrações acima de 12,5% com 24 e 48 horas de tratamento e em todas as concentrações com 72 horas.

Figura 13 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 (A) e GM-07492A (B) tratadas com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes não lavados de melancia



A.



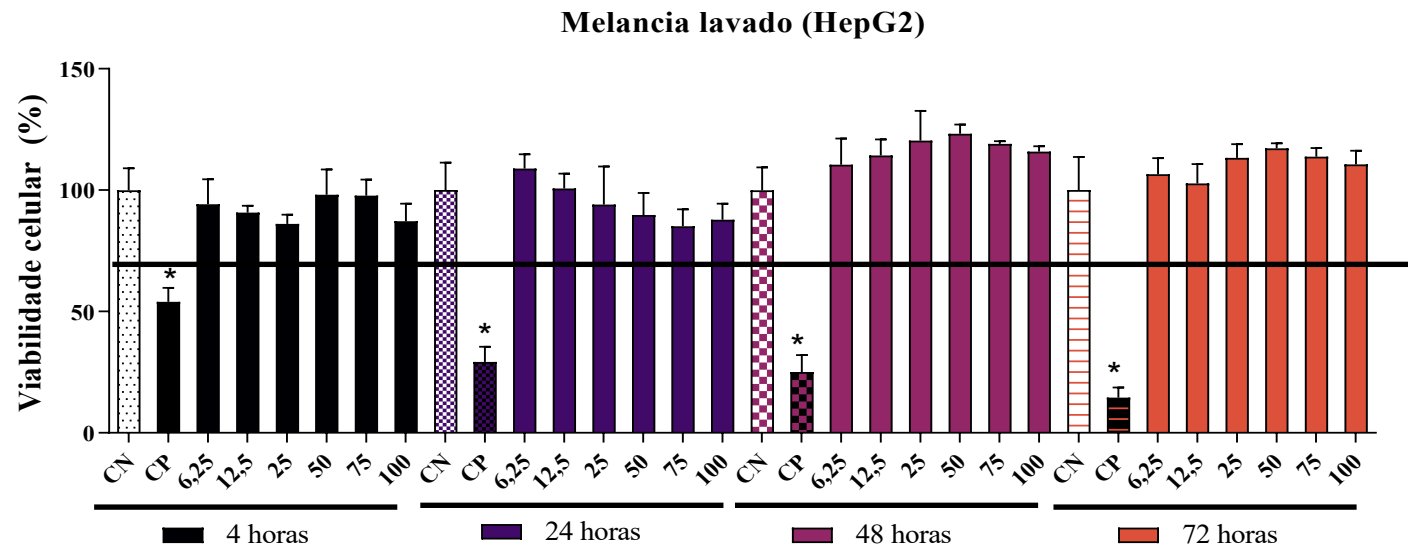
B.

CN: controle negativo (DMEM com 10% de soro bovino fetal); CP: controle positivo (DMSO 50%); Resultados obtidos de três ensaios independentes.

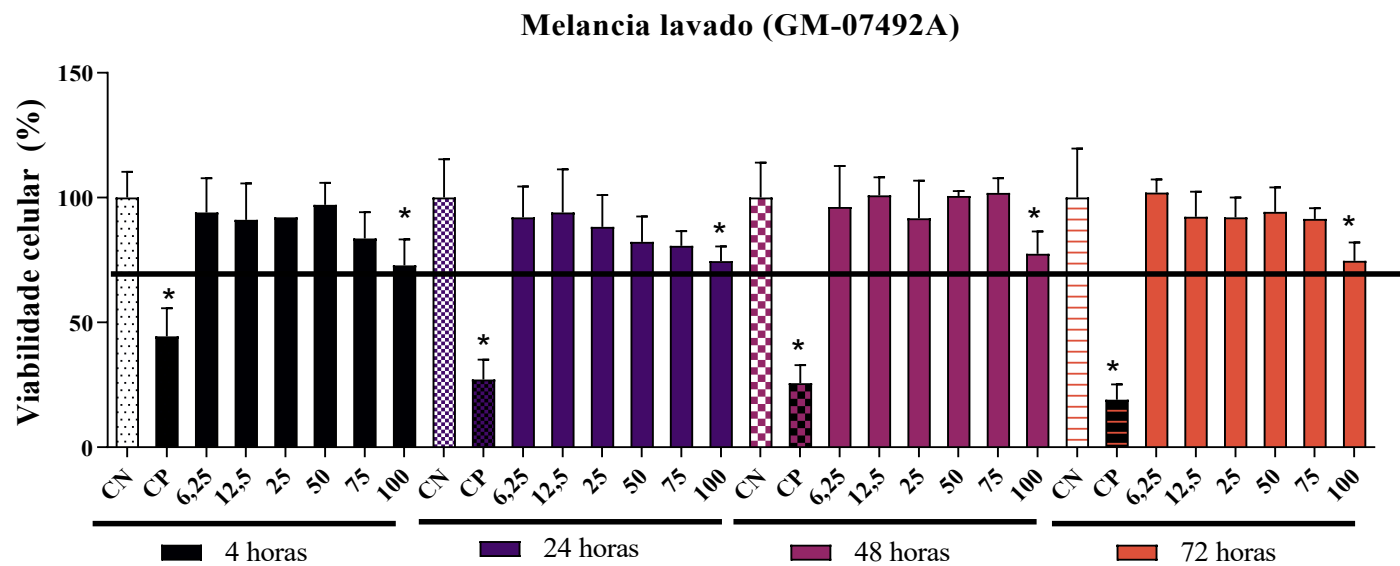
*estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

Por outro lado, os filmes lavados de melancia (Figura 14) não interferiram na viabilidade das células HepG2 (Figura 14A) e induziram uma redução estatisticamente significativa em todos os tempos de tratamento frente as células GM-07492A (Figura 14B), entretanto na maior concentração avaliada.

Figura 14 - Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 (A) e GM-07492A (B) tratadas com diferentes concentrações dos eluatos dos filmes lavados de melancia



A.



B.

CN: controle negativo (DMEM com 10% de soro bovino fetal); CP: controle positivo (DMSO 50%); Resultados obtidos de três ensaios independentes.

*estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

4.2 Teste de Ames

Sobre a mutagenicidade, os dados apresentados nas Tabelas 1 e 2 mostram a média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade (IM) nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *S. Typhimurium*, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

As linhagens não mostraram sinais de toxicidade frente aos diferentes tratamentos, permitindo assim avaliar a mutagenicidade nas condições experimentais utilizadas. A toxicidade pode ser evidenciada pela redução no número de revertentes His+ ou como um crescimento de fundo (*background*) nas placas de ágar mínimo, o que não aconteceu no presente estudo.

De acordo com os dados obtidos, os filmes de melão e melancia não lavados, apresentaram um aumento na média de colônias revertentes somente na linhagem TA97a, com e sem S9 (Tabelas 1 e 2). No entanto, estes resultados não caracterizam os filmes não lavados como sendo mutagênicos pelo teste de Ames, pois o aumento de revertentes não teve uma correlação dose-resposta e IM não foi maior que 2 em nenhuma das concentrações testadas.

Os filmes lavados, tanto de melão (Tabela 1) como de melancia (Tabela 2) também não foram mutagênicos, pois não induziram qualquer aumento estatisticamente significativo no número de revertentes em relação ao controle negativo, em nenhuma das concentrações e cepas de *S. Typhimurium* analisadas, nos experimentos com e sem ativação metabólica. Além disso, o IM também foi menor que 2 em todas as concentrações testadas.

Tabela 1 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella* Typhimurium após o tratamento com diferentes volumes de eluatos de filmes de melão não lavados e lavados, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

Número de revertentes (M±DP)/ placa e IM								
Tratamentos	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
C-	149 ± 17	165 ± 13	30 ± 9	26 ± 6	121 ± 20	122 ± 19	270 ± 35	258 ± 41
C+	1238 ± 85 ^a	1632 ± 120 ^d	829 ± 37 ^a	1537 ± 81 ^d	1945 ± 218 ^b	1768 ± 142 ^d	1943 ± 110 ^c	1533 ± 94 ^e
μL/ placa			Melão não lavado					
12,5	186 ± 18 (1,24)	250 ± 14*(1,52)	35 ± 9 (1,17)	31 ± 8 (1,20)	157 ± 11 (1,29)	126 ± 14 (1,04)	319 ± 22 (1,18)	275 ± 9 (1,07)
25	203 ± 25 (1,36)	257 ± 11*(1,56)	28 ± 5 (0,93)	28 ± 1 (1,08)	137 ± 19 (1,13)	121 ± 18 (1,00)	284 ± 13 (1,05)	243 ± 12 (0,94)
50	201 ± 17 (1,35)	275 ± 21*(1,67)	29 ± 8 (0,97)	32 ± 4 (1,25)	153 ± 11 (1,26)	131 ± 23 (1,08)	338 ± 32 (1,25)	278 ± 39 (1,08)
75	214 ± 11 (1,44)	270 ± 18*(1,64)	30 ± 2 (1,02)	27 ± 2 (1,04)	157 ± 18 (1,30)	119 ± 6 (0,98)	356 ± 25 (1,32)	258 ± 11 (1,00)
100	233 ± 11* (1,56)	251 ± 9* (1,52)	37 ± 3 (1,25)	29 ± 6 (1,12)	149 ± 13 (1,23)	138 ± 21 (1,13)	329 ± 17 (1,22)	235 ± 25 (0,91)
μL/ placa			Melão lavado					
12,5	165 ± 25 (1,10)	224 ± 32 (1,36)	33 ± 2 (1,12)	27 ± 7 (1,06)	154 ± 15 (1,27)	118 ± 9 (0,97)	289 ± 30 (1,07)	310 ± 23 (1,20)
25	163 ± 17 (1,09)	236 ± 20 (1,43)	32 ± 1 (1,08)	28 ± 8 (1,08)	142 ± 18 (1,17)	119 ± 17 (0,98)	292 ± 11 (1,08)	328 ± 32 (1,27)
50	170 ± 8 (1,14)	227 ± 15 (1,38)	36 ± 2 (1,22)	23 ± 2 (0,90)	125 ± 20 (1,03)	121 ± 12 (1,00)	312 ± 26 (1,16)	305 ± 49 (1,18)
75	167 ± 11 (1,12)	225 ± 32 (1,36)	33 ± 8 (1,12)	25 ± 1 (0,96)	131 ± 13 (1,08)	151 ± 20 (1,24)	351 ± 32 (1,30)	339 ± 36 (1,31)
100	160 ± 10 (1,07)	238 ± 16 (1,44)	34 ± 3 (1,15)	24 ± 5 (0,92)	124 ± 8 (1,02)	136 ± 8 (1,12)	290 ± 18 (1,07)	358 ± 11 (1,39)

* $p < 0.05$ (ANOVA); ** $p < 0.01$ (ANOVA); M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; C- = Controle Negativo: dimetilsulfóxido (DMSO – 100 μL/placa); C+ = Controle Positivo – ^a4-nitro-o-fenilenodiamina (10,0 μg/placa – TA98, TA97a); ^bazida sódica (1,25 μg/placa – TA100); ^cmitomicina (0,5 μg/placa – TA102), na ausência de S9 e ^d2-antramina (1,25 μg/placa – TA97a, TA98, TA100); ^e2-aminofluorene (10,0 μg/placa – TA102), na presença de S9. Valores entre parênteses (IM) ≥ 2 indicam mutagenicidade.

Tabela 2 - Atividade mutagênica expressa pela média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA97a, TA98, TA100 e TA102 de *Salmonella Typhimurium* após o tratamento com diferentes volumes de eluatos de filmes de melancia não lavados e lavados, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Número de revertentes (M±DP)/ placa e IM								
Tratamentos	TA97a		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
C-	149 ± 17	165 ± 13	30 ± 9	26 ± 6	121 ± 20	122 ± 19	270 ± 35	258 ± 41
C+	1238 ± 85 ^a	1632 ± 120 ^d	829 ± 37 ^a	1537 ± 81 ^d	1945 ± 218 ^b	1768 ± 142 ^d	1943 ± 110 ^c	1533 ± 94 ^e
μL/ placa	Melancia não lavada							
12,5	188 ± 11 (1,26)	226 ± 14 (1,37)	33 ± 6 (1,12)	23 ± 4 (0,90)	115 ± 17 (0,95)	137 ± 22 (1,12)	325 ± 33 (1,20)	348 ± 48 (1,35)
25	213 ± 23 (1,43)	258 ± 15* (1,56)	27 ± 4 (0,92)	28 ± 6 (1,08)	148 ± 14 (1,22)	129 ± 12 (1,06)	314 ± 21 (1,16)	340 ± 28 (1,32)
50	207 ± 13 (1,39)	255 ± 28* (1,55)	31 ± 3 (1,05)	29 ± 3 (1,14)	159 ± 22 (1,30)	135 ± 19 (1,11)	285 ± 15 (1,06)	305 ± 17 (1,18)
75	245 ± 4* (1,64)	263 ± 9* (1,59)	30 ± 1 (1,02)	28 ± 6 (1,08)	170 ± 10 (1,40)	114 ± 5 (0,93)	343 ± 29 (1,27)	256 ± 32 (0,99)
100	239 ± 19* (1,60)	266 ± 19* (1,61)	28 ± 4 (0,93)	31 ± 4 (1,22)	177 ± 15 (1,46)	136 ± 14 (1,12)	356 ± 35 (1,32)	283 ± 46 (1,09)
μL/ placa	Melancia lavada							
12,5	190 ± 8 (1,28)	183 ± 22 (1,11)	35 ± 8 (1,19)	32 ± 3 (1,25)	147 ± 5 (1,21)	126 ± 17 (1,04)	270 ± 45 (1,00)	331 ± 13 (1,28)
25	166 ± 12 (1,11)	234 ± 18 (1,42)	37 ± 5 (1,25)	34 ± 6 (1,33)	155 ± 12 (1,28)	143 ± 12 (1,17)	272 ± 17 (1,01)	364 ± 12 (1,41)
50	171 ± 15 (1,15)	242 ± 6 (1,47)	30 ± 6 (1,02)	32 ± 2 (1,24)	129 ± 9 (1,07)	116 ± 9 (0,95)	248 ± 16 (0,92)	301 ± 20 (1,17)
75	165 ± 7 (1,11)	237 ± 23 (1,43)	33 ± 8 (1,12)	26 ± 8 (1,00)	124 ± 11 (1,02)	114 ± 10 (0,94)	338 ± 46 (1,25)	269 ± 37 (1,04)
100	164 ± 9 (1,10)	240 ± 6 (1,45)	39 ± 9 (1,32)	29 ± 6 (1,14)	118 ± 3 (0,98)	115 ± 17 (0,95)	329 ± 29 (1,22)	330 ± 28 (1,28)

* $p < 0.05$ (ANOVA); ** $p < 0.01$ (ANOVA); M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; C- = Controle Negativo: dimetilsulfóxido (DMSO – 100 μL/placa); C+ = Controle Positivo – 4-nitro-o-fenilenodiamina (10,0 μg/placa – TA98, TA97a); ^bazida sódica (1,25 μg/placa – TA100); ^cmitomicina (0,5 μg/placa – TA102), na ausência de S9 e ^d2-antramina (1,25 μg/placa – TA97a, TA98, TA100); ^e2-aminofluorene (10,0 μg/placa – TA102), na presença de S9. Valores entre parênteses (IM) ≥ 2 indicam mutagenicidade

4.3 Ensaio do Micronúcleo

No ensaio do MN, os resultados estão apresentados na Tabela 3, não foi observado um aumento estatisticamente significativo na frequência de MNs nas células analisadas em nenhuma das amostras e concentrações avaliadas comparado ao controle negativo.

Outro parâmetro avaliado neste ensaio foi o IPBC. Todos os grupos de tratamento provocaram uma redução estatística dos valores de IPBC comparado ao controle negativo, mas os resultados não diferem estatisticamente entre eles e não foram dose-dependentes.

Tabela 3 - Frequência de micronúcleos (MNs) e índice de proliferação com bloqueio de citocinese (IPBC) em células CHO após 4 horas de tratamento e HepG2 após 24 horas de tratamento com os eluatos dos filmes de melão e melancia (lavados e não lavados)

Tratamentos	CHO		HepG2	
	MNs ^a	IPBC ^b	MNs ^a	IPBC ^b
CN	4,0 ± 1,0	1,85 ± 0,04	7,7 ± 1,5	2,01 ± 0,04
CP	32,0 ± 5,3*	1,66 ± 0,15	25,7 ± 3,5*	2,02 ± 0,03
Melancia NL				
3,125%	3,0 ± 1,0	1,71 ± 0,12*	9,0 ± 1,0	2,01 ± 0,06
6,25%	3,0 ± 2,0	1,76 ± 0,04	11,7 ± 1,5	2,03 ± 0,01
12,5%	6,0 ± 2,0	1,75 ± 0,06*	-	-
Melancia L				
6,25%	3,0 ± 2,0	1,82 ± 0,02	2,0 ± 1,0*	1,88 ± 0,06*
12,5%	3,3 ± 1,5	1,71 ± 0,03*	3,7 ± 1,5*	1,89 ± 0,05*
25%	5,0 ± 1,0	1,72 ± 0,04*	7,7 ± 1,5	1,84 ± 0,04*
50%	5,7 ± 1,5	1,73 ± 0,03*	7,0 ± 2,0	1,71 ± 0,13*
Melão NL				
3,125%	3,0 ± 1,0	1,71 ± 0,04*	6,7 ± 1,5	1,99 ± 0,02
6,25%	6,0 ± 1,0	1,72 ± 0,02*	8,7 ± 2,5	1,98 ± 0,06
12,5%	5,3 ± 3,1	1,68 ± 0,03*	6,0 ± 1,0	1,94 ± 0,10*
Melão L				
6,25%	4,0 ± 1,0	1,78 ± 0,04*	2,3 ± 0,6*	1,91 ± 0,04*
12,5%	4,7 ± 2,1	1,75 ± 0,02*	2,3 ± 1,5*	1,97 ± 0,04
25%	4,0 ± 1,0	1,76 ± 0,03*	4,3 ± 1,5	1,93 ± 0,03*
50%	3,3 ± 1,5	1,75 ± 0,09*	5,3 ± 2,3	1,87 ± 0,06*

Os valores são apresentados como média ± DP do número de micronúcleos (MNs) e índice de proliferação com bloqueio da citocinese (IPBC) em células CHO (4 horas de tratamento) e HepG2 (24 horas de tratamento). CN: controle negativo (meio de cultura completo), CS: controle solvente (DMSO, 0,0025%), CP: controle positivo (peróxido de hidrogênio, 100 µM, experimentos com CHO e aflatoxina B₁, 5 µM, experimentos com HepG2).

^aUm total de 6000 células binucleadas foram analisadas por grupo de tratamento (2000 células/tratamento/repetição).

^bUm total de 1500 células foram analisadas por grupo de tratamento (500 células/tratamento/repetição).

* $p < 0,05$ estatisticamente diferente do controle negativo

4.4 Antimutagenicidade

Os resultados obtidos dos ensaios de antimutagenicidade apresentados na Tabela 4 expressam a média do número de revertentes/placa (M), desvio padrão (DP) e porcentagem de inibição da atividade mutagênica do mutágeno B[a]P, na linhagem TA98.

A mutagenicidade do B[a]P foi significativamente reduzida tanto pelos filmes de melão como de melancia lavados e não lavados.

A porcentagem de inibição máxima para os filmes não lavados de melão foi de 53,5% e para os de melancia de 52,7%, ambos na maior concentração avaliada. Já para os filmes lavados, o potencial antimutagênico foi moderado, com porcentagem de inibição máxima de 37,1% para os filmes de melão e de 33,2% para os de melancia, também na maior concentração testada.

As associações de eluatos e mutágeno não induziram citotoxicidade quando avaliadas no ensaio de viabilidade celular, comprovando que o efeito antimutagênico observado, não foi por indução de morte da *Salmonella* e sim por mecanismos de antimutagênese.

Tabela 4 - Atividade antimutagênica expressa pela média e desvio-padrão do número de revertentes/ placa e a porcentagem de inibição frente ao mutágeno benzo[a]pireno na linhagem TA98 de *Salmonella Typhimurium* tratadas com filmes de melancia e melão (não lavados)

Número de revertentes (M ± DP)/ placa e % de inibição				
TA98 (+S9)				
Tratamentos				
B[a]P	192 ± 15			
C-	29 ± 3			
	Melancia NL +	Melancia L +	Melão NL +	Melão L +
	B[a]P	B[a]P	B[a]P	B[a]P
1	129 ± 4 (32,9 ^b)	184 ± 11 (3,9 ^a)	141 ± 16 (26,4 ^b)	144 ± 23 (25,1 ^b)
2	153 ± 9 (20,1 ^a)	141 ± 18 (26,6 ^b)	98 ± 11 (48,8 ^c)	148 ± 16 (22,7 ^a)
3	140 ± 7 (26,9 ^b)	166 ± 8 (13,3 ^a)	112 ± 9 (41,5 ^c)	152 ± 14 (20,6 ^a)
4	113 ± 4 (41,3 ^c)	141 ± 7 (26,4 ^b)	98 ± 18 (48,8 ^c)	142 ± 7 (25,8 ^b)
5	91 ± 6 (52,7 ^c)	128 ± 7 (33,2 ^b)	89 ± 4 (53,5 ^c)	121 ± 5 (37,1 ^b)

* Os tratamentos foram realizados como descritos na Tabela x (item xxx, seção Material e Métodos
M ± DP = média e desvio padrão; NL = não lavado; L = lavado; C- = Controle negativo (dimetilsulfóxido, DMSO, 100 µL/placa); B[a]P = benzo[a]pireno (1,0 µg/ placa, 50 µL/placa).

^aEfeito não-antimutagênico (< 25% de inibição)

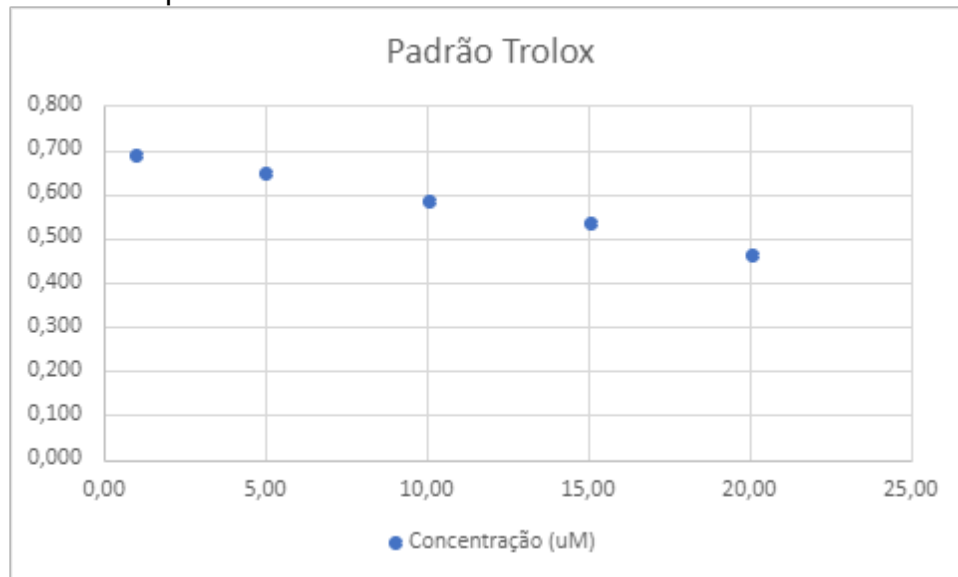
^bEfeito moderado (25% > 40% de inibição)

^cEfeito forte (> 40% de inibição)

4.5 Atividade Antioxidante

Sobre a atividade antioxidante, a Figura 15 representa a curva de calibração ($y=ax+b$) obtida por meio da média das absorbâncias do padrão Trolox e suas concentrações, sendo que $y=0,01606087x + r^2=0,9998$.

Figura 15 - Curva padrão de Trolox



As amostras testadas apresentaram maior redução ou inibição do radical ABTS^{•+} quando comparado ao padrão Trolox (Tabela 5). Os filmes de melão não lavados e lavados apresentaram maior inibição, seguido por melancia não lavado e melancia lavado.

Tabela 5 - Atividade antioxidante das amostras expressa em quantidade equivalente de Trolox por grama de filme (μM trolox/g)

Amostra	Atividade antioxidante (μM trolox/g)
Filme de melão não lavado	3181 \pm 99
Filme de melão lavado	3020 \pm 149
Filme de melancia não lavado	2771 \pm 47
Filme de melancia lavado	2652 \pm 608
Padrão Trolox	1965 \pm 30

5. Discussão

Este é o primeiro estudo da avaliação cito-genotóxica de filmes poliméricos de melão e melancia considerando a análise de potenciais riscos associados ao seu uso, além da avaliação da atividade antimutagênica e antioxidante.

Estes biomateriais constituem uma proposta inédita e inovadora com aplicabilidade em diversos setores industriais, incluindo a indústria alimentícia envolvendo a tecnologia de alimentos como embalagens/filmes comestíveis ou nas áreas biomédicas e farmacêuticas, como biocurativos, plataformas de liberação de fármacos ou cosmetologia. Além disso, é necessário destacar que os filmes poliméricos avaliados neste estudo foram produzidos de subprodutos das frutas, ou seja, entrecasas (mesocarpo), o que normalmente são descartados durante o processamento e consumo, constituindo um sério problema ambiental (MALLEK-AYADI *et al.*, 2017). Assim, a produção desses filmes multifuncionais pode colaborar para minimizar resíduos vegetais lançados no meio ambiente, evitando o desperdício de alimento.

Akhter *et al.* (2019) desenvolveram um filme de embalagem a base de alecrim, óleo essencial de menta, nisina e ácido lático, além de pectina de quitosana e polímeros de amido. Tal material apresentou atividade antimicrobiana e antioxidante, demonstrando que a incorporação de aditivos naturais em filmes biocompósitos ativos oferece ingredientes funcionais promissores para materiais de embalagens para várias aplicações alimentares.

Na indústria de cosméticos, os polímeros naturais também apresentam vantagens, pois de forma natural podem ser usados como ingredientes regenerativos (SIONKOWSKA, 2015).

Sica de Toledo *et al.* (2015) produziram filmes a partir de subprodutos da preparação de extratos de própolis (resíduos descartados durante a preparação de extratos de própolis), na presença e ausência de um adjuvante polimérico (gelatina ou etilcelulose) e propilenoglicol. Com base nas características mecânicas do material obtido, os autores acreditam no uso destes filmes na indústria alimentícia e farmacêutica.

Diversos fatores contribuem para despertar o interesse no uso de resíduos naturais na produção de materiais inovadores, como a consciência ecológica geral, a implementação do conceito dos três Rs (reduzir, reutilizar, reciclar) e a produção

de resíduos ricos em biopolímeros e que apresentam características de formação de filme das indústrias agrícola, farmacêutica, pecuária, pesqueira e alimentícia, entre outras. Além de serem ecologicamente corretos, são fontes de compostos bioativos com potencial atividade biológica e farmacológica com benefícios para o homem (SICA DE TOLEDO *et al.*, 2015). Entretanto, além da avaliação das características microscópicas, químicas, térmicas e mecânicas desses novos materiais, a biocompatibilidade e toxicidade devem ser investigadas.

A avaliação da viabilidade celular em diferentes tempos de tratamento revelou que os resultados dos filmes não lavados foram estatisticamente superiores (mais citotóxicos) aos dos lavados, tanto de melão como de melancia. Analisando os resultados, o padrão de resposta citotóxica foi dependente da concentração e semelhante entre as duas células (HepG2 e GM-07492A) analisadas. O tempo de tratamento induziu alterações nos resultados de viabilidade celular, mas não foi possível traçar um perfil de resposta citotóxica dependente do período de exposição, pois em todos os tempos de tratamento, nas maiores concentrações testadas foi possível detectar redução de células viáveis, especialmente nos tratamentos com os filmes não lavados.

A literatura mostra que o extrato aquoso de *C. melo* (melão) possui atividade citotóxica dependendo da dose em linhagens de célula de câncer de próstata humanos (PC-3) (ITTIYAVIRAH *et al.*, 2013). Rolim *et al.*, (2018) avaliaram a atividade antiproliferativa dos extratos hidroetanólico, hidrometanólico e aquoso das cascas e sementes de melão frente às células HeLa e SiHa (células tumorais do colo do útero humano), 786-0 (carcinoma renal), HT-29 (carcinoma de cólon) e células normais 3T3 (fibroblastos de camundongo). Os resultados mostraram que os extratos de casca e sementes de melão apresentaram baixa toxicidade nas células 3T3 e promissora atividade antitumoral, com destaque para os extratos de sementes e o extrato hidroetanólico das cascas, também dependente da dose testada. Além disso, os autores apoiam que a atividade antiproliferativa está possivelmente relacionada à quantidade de compostos fenólicos presentes nos extratos (ROLIM *et al.*, 2018).

Zhang *et al.* (2020) demonstraram que diferentes extratos dos frutos inteiros e sementes de melão (metanólico, clorofórmio e aquoso) tem a capacidade de inibir diferentes células cancerígenas de maneira dose-dependente. As células avaliadas no estudo foram PC-3, de câncer de cólon humano (HCT116), de linfócitos T

humanos imortalizados (Jurkat) e HeLa, e o extrato com o maior potencial citotóxico foi o clorofórmio. Os autores concluem que a maior citotoxicidade observada no extrato da fruta inteira pode ser devido aos maiores níveis de compostos bioativos presentes nele, como ácido gálico e rutina.

Na casca do melão (maazoun cultivar), Mallek-Ayadi *et al* (2017) identificaram que os ácidos hidroxibenzoicos e as flavonas constituem suas principais classes fenólicas. O ácido 3-hidroxibenzoico é o principal composto fenólico na casca do melão com 33,45 mg/100 g, seguido pela apigenina-7-glicosídeo (29,34 mg/100 g).

Apesar dos estudos mencionados aqui serem para elucidar a atividade antitumoral do melão, eles mostram a capacidade que diferentes extratos da fruta têm de inibir a proliferação celular dependendo da concentração utilizada.

A casca da melancia também contém fitoquímicos de vital importância farmacêutica, como vitaminas, citrulina e polifenóis, além de proteínas, sais minerais, carboidratos e gordura (DAMMAK *et al.*, 2019). Os metabólitos secundários com potencial nutracêutico presentes em diferentes tecidos da melancia atuam em diferentes alvos potenciais de drogas envolvidos em doenças como diabetes, câncer, inflamação e obesidade (MANIVANNAN *et al.*, 2020). De acordo com análise fitoquímica de Neglo *et al* (2021), alcalóides e açúcares redutores livres foram identificados em todas as partes da melancia; flavonoides na casca e sementes; taninos apenas na casca; triterpenóides na polpa e nas sementes; e saponinas ausentes nas sementes.

Apesar da casca/entrecasca da melancia ser comestível, ricas em nutrientes e compostos bioativos (HIDDER *et al.*, 2020), poucos estudos comprovando seu potencial biológico/farmacológico e sua segurança por meio de ensaios que avaliam parâmetros toxicológicos são encontrados na literatura.

Feizy *et al.* (2020) mostraram que a casca de melancia contém proteínas (6,77 g/ 100g), gordura (0,92 g/ 100g), cinzas (13,2 g/ 100g), fibra (24 g/ 100g), minerais como sódio (53,59 mg/ 100g), potássio (2074 mg/ 100g), cálcio (468 mg/ 100g), cobre (0,59 mg/ 100g), ferro (12,08 mg/ 100g), magnésio (164,48 mg/ 100g), zinco (0,91 mg/ 100g) e fósforo (107 mg/ 100g), além de polifenóis com potencial antioxidante.

Arojojoye *et al.* (2018) investigaram a toxicidade subcrônica e efeito no fígado e rim de ratos após 28 dias de tratamento com 500, 1500 e 3500 mg/Kg do extrato da

casca de melancia. Os resultados mostraram que o extrato de casca de melancia não tem efeitos adversos no fígado e nos rins dos ratos e foi considerado seguro para o consumo humano.

Com relação a citotoxicidade *in vitro*, Dammak *et al.* (2019) extraíram diferentes polissacarídeos da casca da melancia e avaliaram a atividade citotóxica frente as células Hep-2 (uma célula epitelial humana tipo 2, originada de um carcinoma da laringe humana) pelo ensaio do MTT. A resposta citotóxica foi dose-dependente; na concentração de 2,5 µg/ mL, ocorreu 25,93% de inibição, enquanto que na concentração de 10 µg/ mL foi de 65,02%.

O sistema-teste usado no presente estudo, o ensaio do MTT, é baseado na redução dos derivados do tetrazólio em células vivas pelas desidrogenases mitocondriais, o que permite estimar a atividade de células metabolicamente ativas. A detecção é quantitativa e sensível, pois mede a viabilidade/sobrevivência celular (contagem de células) e a proliferação de células (ensaios de cultura de células), em virtude de uma relação linear entre a atividade celular e a absorbância (Rolim *et al.*, 2018; Dammak *et al.*, 2019).

Além da citotoxicidade, a mutagenicidade também foi avaliada. Os testes que avaliam o potencial mutagênico buscam colaborar na identificação do perfil de segurança de novos produtos diante da preocupação toxicológica de agirem como mutágenos reativos ao DNA. Como o dano ao DNA é um processo biológico complexo que envolve vários mecanismos de ação, diversos ensaios estão disponíveis como ferramentas de triagem para prever corretamente os efeitos adversos das substâncias. Por isso, na análise genotoxicológica, uma bateria de testes deve ser realizada (BOLOGNESI *et al.*, 2017; RAINER *et al.*, 2019; PINTER *et al.*, 2020).

Sinais de mutagenicidade foram evidenciados na linhagem TA97a, com e sem S9 (filmes não lavados de melão e melancia) devido ao aumento do número de revertentes comparado ao controle negativo. Essa cepa detecta mutações de deslocamento de quadro de leitura C-G (TA97a) (MORTELMANS; ZEIGER, 2000).

A ausência de mutagenicidade dos filmes lavados de melão e melancia demonstrada neste estudo é extremamente relevante, pois fornece dados animadores para continuação das pesquisas com esse tipo de material. E com relação aos filmes não lavados, de acordo com os parâmetros toxicológicos analisados, eles devem ser usados com cautela.

No ensaio do MNs, a escolha das células usadas é que CHO-K1 é uma linhagem padrão para testes de genotoxicidade (OECD, 2016) e HepG2 são amplamente usadas devido às habilidades de biotransformação (FREGONEZI *et al.*, 2020).

Barreto *et al.* (2020) avaliaram a citotoxicidade e mutagenicidade de eluatos de filmes poliméricos de *Allium cepa* L (cebola), lavados e não lavados, obtidos pelo mesmo processamento realizado no presente estudo. Os filmes não lavados foram mais citotóxicos que os lavados, ambos não induziram mutações cromossômicas quando avaliados pelo ensaio do micronúcleo, mas os não lavados provocaram sinais de mutagenicidade no teste de Ames (mutações gênicas).

Embora constituídos de fontes naturais, da biomassa, os filmes poliméricos podem conter compostos com potencial tóxico, induzir efeitos colaterais, e/ou apresentar características indesejáveis como mutagenicidade, carcinogenicidade e teratogenicidade, limitando assim suas aplicações. Dantas, *et al.*, (2020) elaboraram uma revisão sistemática do potencial mutagênico de plantas medicinais avaliadas pelo teste de Ames. Dos artigos selecionados, tinham estudos de 478 espécies distribuídas em 111 famílias botânicas, sendo Fabaceae, Asteraceae e Lamiaceae as mais frequentes. A maioria não eram mutagênicas (388 espécies) e muitas apresentaram inclusive potencial antimutagênico (21%, 83/388). No entanto, os resultados também indicaram que 18% (90/478) das espécies eram mutagênicas, das quais 54% eram mutagênicas na presença e ausência de S9.

Sobre a antimutagenicidade, os filmes não lavados, tanto de melão quanto de melancia, tiveram maior capacidade de inibir a mutagenicidade do B[a]P do que os filmes lavados, provavelmente devido a concentração dos fitoquímicos presentes na amostra.

O B[a]P, agente indutor de danos usado neste estudo, é um hidrocarboneto aromático policíclico, mutagênico, teratogênico, um pró-carcinógeno ambiental conhecido que tem a capacidade de ativar oncogenes. Como é formado durante a combustão incompleta de matéria orgânica, é um poluente presente em alimentos e água contaminados e em partículas do ar (XIA *et al.*, 2011). Já foi demonstrado que o B[a]P pode ser o carcinógeno na fumaça do cigarro responsável pelas mutações no p53 detectadas em tumores pulmonares de fumantes (DENISSENKO *et al.*, 1996, 1998). Tal mutágeno é metabolizado dentro de muitas células e passa por um processo de várias etapas envolvendo CYP1A1, sendo então convertido em

carcinógeno final (\pm)-benzo[a]pireno-7,8-diol,9,10-epóxido (SCHWARZ *et al.*, 2001) que alquila na molécula de DNA, induzindo aductos de DNA estáveis e depurinados (CHAKRAVARTI *et al.*, 2008). Por isso, neste estudo, os ensaios foram conduzidos na presença da fração S9.

Neste estudo, os compostos extraídos dos filmes durante a preparação dos eluatos podem ter interagido com o intermediário ativo do B[a]P diminuindo a formação de aductos de DNA induzidos pelo mutágeno ou ter interferido nas enzimas microssomais impedindo a metabolização do B[a]P. Além disso, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos são conhecidos pela produção de espécies reativas de oxigênio (UHL *et al.*, 2003) os fitoquímicos extraídos podem ter reduzido o estresse oxidativo e conseqüentemente induziram antimutagenicidade, já que os filmes apresentaram atividade antioxidante e diversos compostos do melão e melancia são conhecidos pelo seu potencial antioxidante (ZEB, 2016; LESTER, 2008; ROLIM *et al.*, 2018; AJIBOYE, SHONIBARE, OYINLOYE, 2020; MANIVANNAN *et al.*, 2020).

Considerando que radicais livres, reações químicas e algumas reações redox de diferentes compostos podem ser uma fonte de dano oxidativo de macromoléculas em células vivas e que essa destruição provoca câncer, doenças neurodegenerativas, diabetes mellitus e doenças inflamatórias, a comprovação do potencial antimutagênico e antioxidante dos filmes avaliados neste estudo agrega ainda mais valor a estes biomateriais.

O ensaio ABTS^{•+} é aplicável a antioxidantes lipofílicos e hidrofílicos incluindo, flavonóides, hidroxicinamatos, carotenóides e antioxidantes plasmáticos, devido a sensibilidade do cátion radical ABTS^{•+}. A oxidação do ABTS^{•+} com o persulfato de potássio é reduzida na presença de antioxidantes doadores de hidrogênio, assim a intensidade da solução ABTS^{•+} diminui dependendo da quantidade e natureza do antioxidante presente na amostra, podendo então ser quantificada (NEGLO *et al.*, 2021; ASHGAR *et al.*, 2013; RE *et al.*, 1999; ILYASOV *et al.*, 2020).

Os filmes de melão (não lavados e lavados) apresentaram maior redução do radical ABTS^{•+}, seguido dos filmes de melancia (não lavados e lavados) quando comparados ao padrão Trolox.

Na avaliação da atividade antioxidante realizada por Rolim *et al.* (2018) de extratos de cascas e sementes de melão, os resultados mostraram que todos os extratos interagiram com os sistemas doadores de elétrons para minimizar o ataque dos radicais livres, com destaque para o extrato etanólico da casca. Além disso,

principalmente o extrato aquoso da casca apresentou potencial para quelação de ferro e todos os extratos da casca apresentaram atividade quelante de cobre acima de 50%, o que é extremamente relevante, uma vez que a exposição excessiva e crônica aos metais pode também gerar espécies reativas de oxigênio e induzir danos celulares, o que também culmina no estímulo a processos inflamatórios, que podem levar ao desenvolvimento de câncer. Ademais, os extratos metanólicos e etanólicos da casca de melão apresentaram atividade sequestrante de radicais hidroxila de maneira dose-dependente.

Sobre as cascas de melancia, Feizy *et al.* (2020) mostraram que além de serem uma boa fonte de polifenóis naturais e minerais, apresentam potencial antioxidante. Neglo *et al.* (2021) também mostraram que a casca e entrecasca da melancia apresentam atividade sequestrante superior a 90% quando avaliado pelo ensaio ABTS^{•+}.

Frente a tudo isso, de uma maneira geral, os resultados do presente estudo colaboram nas análises genotoxicológicas necessárias para assegurar o uso dos filmes poliméricos de melão e melancia em diversas aplicabilidades industriais. Os filmes lavados são mais seguros que os não lavados, com menor citotoxicidade e ausência de mutagenicidade. Além disso, mostram que estes biomateriais feitos de partes normalmente não consumidas das frutas podem ter valor terapêutico e, portanto, a reutilização desses subprodutos, pode trazer ganhos econômicos mensuráveis e contribuir para a redução da poluição introduzida pelas indústrias de frutas e vegetais no meio ambiente.

6. CONCLUSÕES

O estudo sobre a citotoxicidade, (anti) mutagenicidade e atividade antioxidante dos eluatos dos filmes poliméricos nomeados lavados e não lavados de melão e melancia, nas condições utilizadas, levou às seguintes conclusões:

- Os filmes lavados e não lavados apresentaram potencial citotóxico semelhante frente as duas linhagens celulares avaliadas, de maneira dose-dependente;
- Os diferentes tempos de tratamento nos ensaios de viabilidade celular induziram alterações nos resultados de citotoxicidade;
- Os filmes não lavados foram mais citotóxicos que os filmes lavados;
- Os filmes não lavados, de melão e melancia, induziram sinais de mutagenicidade no teste de Ames;
- Os filmes lavados de melão e melancia não induziram mutações gênicas, nem cromossômicas, nas condições experimentais utilizadas;
- Os filmes não lavados, tanto de melão como de melancia, tiveram maior potencial antimutagênico contra o B[a]P do que os filmes lavados;
- Todas as amostras apresentaram potencial antioxidante quando comparado ao padrão Trolox.

De uma maneira geral, os filmes lavados de melão e melancia apresentaram maior segurança genotoxicológica em relação aos filmes não lavados, sendo indicado para o uso na indústria, como por exemplo, de alimentos (filmes alimentícios) e biomateriais (substrato para o sistema de entrega de drogas). O presente estudo abre novas perspectivas para a valorização da casca de melão e melancia não somente como produtos dietéticos e nutricionais, mas também para que sejam exploradas suas propriedades benéficas em aplicações industriais. O uso de subprodutos do melão e melancia ajudam a reduzir os custos e as preocupações ambientais associadas ao seu descarte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AJIBOYE B. O.; SHONIBARE M. T.; OYINLOYE B. E. **Atividade antidiabética do suco de melancia (*Citrullus lanatus*) em ratos diabéticos induzidos por aloxana.** Journal of Diabetes & Metabolic Disorders, v. 19, p. 343–352, 2020.

AKHTER, R., MASOODI, F. A., WANI, T. A., & RATHER, S. A. **Functional characterization of biopolymer based composite film: Incorporation of natural essential oils and antimicrobial agents.** International Journal of Biological Macromolecules, 2019.

AROJOJOYE, O.; LADOKUN, O.; AMINU, A.; DUROSINLORUN, O. **Short term toxicity on watermelon rind extract.** Croat. J. Food Sci. Technol. 10 (2) 173-178, 2018.

ASHGAR, M. N.; SHAHZAD, M. T.; NADEEM, I.; ASHRAF, C. M. **Phytochemical and in vitro total antioxidant capacity analysis of peel extracts of different cultivars of *Cucumis melo* and *Citrullus lanatus*.** Pharmaceutical Biology. 21:2, 226-232, 2013.

BARBEZAN, A. B.; MARTINS, R.; BUENO, J. B.; VILLAVICENCIO, A. N. C. H. **Ames test to detect mutagenicity of 2-Alkylciclobutanones: A review.** Journal of Food Science. Vol.82 nº7, 2017.

BARRETO, M. R.; ALEIXO, N. A.; SILVESTRE, R.F.; FREGONEZI, N. F.; BARUD, H. DA S.; DIAS, D. DOS S.; RIBEIRO, C. A; RESENDE, F. A. **Genotoxicological safety assessment of puree-only edible films from onion bulb (*Allium cepa* L.) for use in food packaging-related applications.** Journal of Food Science, v. 85, p. 201-208, 2020.

BARROS, T. T. **Produção e caracterização de filmes de polpa de mamão com adição de nanoestruturas, processados em modo batelada.** 2016. 82fl. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal de São Carlos – SP.

BERNSTEIN, L., J. KALDOR, J. MCCANN AND M.C. PIKE. **An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the Salmonella test.** Mutation Res., 97, 267-281, 1982.

BUENO, R. S. **Desenvolvimento de filmes funcionais incorporando extrato de *Acmella oleracea* para fins cosméticos e antimicrobiano.** 2019. 64 fl. Dissertação

(Mestrado profissional em Inovação Tecnológica) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro – MG.

BOLOGNESI C, CASTOLDI AF, CREBELLI R, BARTHÉLÉMY E, MAURICI D, WÖLFLE D, VOLK K, LAURENCE CASTLE L. **Genotoxicity testing approaches for the safety assessment of substances used in food contact materials prior to their authorization in the European Union.** Environ Mol Mutagen 58:361-374, 2017.

BOUAZIS, A.; DJIDEL, S.; BENTAHAR, A.; KHENNOUF, S. **Polyphenolic content, Antioxidant and Antiinflammatory activities of Melon (*Cucumis melo* L. var. *inodorus*) Seeds.** Journal of Drug Delivery & Therapeutics, 10(2-s):22-26, 2020.

BRONDANI, J. C.; DE LIMA, R.; MACHADO, M. M.; MANFRON, M. P. **Determination of phytochemical composition, cytotoxicity, genotoxicity and mutagenicity of the hydroethanolic extract of *Dolichandra unguis-cati* L. leaves in human leukocytes.** Journal of Herbal Medicine. Vol.22, 2020.

CARDOSO, S. L. **Fotofísica de carotenoides e o papel antioxidante de β -caroteno.** Química Nova. 20(5), 1997.

CHAKRAVARTI, D.; VENUGOPAL D.; MAILANDER P. C.; MEZA J. L.; HIGGINBOTHAM S.; CAVALIERI E. L.; ROGAN E. G. **The role of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in inducing mutations in mouse skin.** Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, v. 649, p. 161 - 178, 2008.

CHOUDHARY, B. R.; SHALDHAR, S. M., MAHESHWARI, S. K.; BHARGAVA, R.; SHARMA, S. K. **Phytochemicals and antioxidants in watermelon (*Citrullus lanatus*) genotypes under hot arid region.** Indian Journal of Agricultural Sciences 85 (3): 414–7, March, 2015.

COCCHI, V.; HRELIA, P.; LENZI, M. **Antimutagenic and Chemopreventive Properties of 6-(Methylsulfinyl) Hexil Isothiocyanate on TK6 Human Cells by Flow Cytometry.** Frontiers in Pharmacology. Vol 11:1242, 2020.

COSTA, A. B. **Compostos fenólicos, capacidade antioxidante e minerais em cascas de melancias “Manchester” e “Smile” proveniente de resíduos de processamento.** 2017. 45fl. Tese (Doutorado em Nutrição Humana) – Universidade de Brasília – DF.

COSTA, A. F. DE S.; ROCHA, M. A. V.; SARUBBO, L. A. **Review – Bacterial Cellulose: na ecofriendly biotextile.** International Journal of Textile and Fashion Technology Vol. 7, Issue 1, 11-26, Feb 2017.

DA CUNHA, J. A.; ROLIM, P. M.; DAMASCENO, K. S. F. D. S. C.; DE SOUSA JÚNIOR, F. C.; NABAS, R. C.; SEABRA, L. M.J. **From seed to flour: Sowing sustainability in the use of cantaloupe melon residue (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*).** PLoS ONE 15(1), jan, 2020.

DA SILVA, A. DE O.; CORTEZ-VEJA, W. R.; PRENTICE, C.; FONSECA, G. G. **Development and characterization of biopolymer films based on bocaiuva (*Acromonia aculeata*) flour.** International Journal of Biological Macromolecules, 2018.

DAMMAK, M. I.; SALEM, Y. B.; BELAID, A.; MANSOUR, H. B.; HAMMAMI, S.; LE CERF, D.; MAJDOUB, H. **Partial characterization and antitumor activity of a polysaccharide isolated from watermelon rinds.** International Journal of Biological Macromolecules. 136: 632-641, 2019.

DANTAS, E. A.; COSTA, S. S.; CRUZ, L. S.; BRAMONT, W. B. COSTA. A. S.; PADILHA, F. F.; DRUZIAN, J. I.; MACHADO, B. A. S. **Caracterização e avaliação das propriedades antioxidantes de filmes biodegradáveis incorporados com polpas de frutas tropicais.** Ciência Rural, Santa Maria, v.45, n.1, p.142-148, jan, 2015.

DANTAS, F. G. DA S., DE CASTILHO, P. F., DE ALMEIDA-APOLONIO, A. A., DE ARAÚJO, R. P., DE OLIVEIRA, K. M. P. **Mutagenic potential of medicinal plants evaluated by the Ames *Salmonella*/microsome assay: A systematic review.** Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 108338, 2020.

DE AMORIN, J. D. P.; DA SILVA JÚNIOR, C. J. G.; COSTA, A. F. S.; SARUBBO, L. A.; DE MELO, J. F. H. **Avaliação do potencial de celulose bacteriana para aplicação em cosméticos.** Brazilian Journal of Development. Curitiba, v. 5, n. 10, p. 18457-18462, sep. 2019.

DENISSENKO M. F.; PAO A.; TANG M.; PFEIFER GP. **Formação preferencial de adutos de benzo [a] pireno em pontos quentes mutacionais de câncer de pulmão em P53.** Science, v. 274, n. 5286, p. 430-432, 1996.

DOHERTY, A. T. **The in vitro micronucleus assay.** Methods Mol. Biol. 817:121-141, 2012.

DUTRA, J. C. V. **Caracterização fisiológica, fitoquímica e de atividades biológicas de plantas medicinais com potencial para produção de fitoterápicos.** 2019. 194fl. Tese (Doutorado em Biologia Vegetal), Universidade Federal do Espírito Santo – ES.

EFSA **Scientific Committee Scientific Opinion on genotoxicity testing strategies applicable to food and feed safety assessment.** EFSA Journal 9(9):2379. [69 pp.], 2011.

EMADIAN, S. M.; ONAY, T.T.; DEMIREL, B. **Biodegradation of bioplastics in natural environments.** Waste Management 59 (2017), 526-536.

ERHIRHIE, E. O.; EKENE, N. E. **Medicinal values on *Citrullus lanatus* (watermelon): Pharmacological review.** International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences Vol. 4 (4) Oct – Dec 2013.

EZZAT, S. M.; RASLAN, M.; SALAMA, M. M.; MENZE, E. T.; HAWARY, S. S. EL. **In vivo anti-inflammatory activity and UPLC-MS/MS profiling of the peels and pulps of *Cucumis melo* var. cantalupensis and *Cucumis melo* var. reticulatus.** Journal of Ethnopharmacology 237, 245–254, 2019.

FARCUH, M.; COPES, B.; LE-NAVENEC, G.; MARROQUIN, J.; JAUNET, T.; CHIHAM, C.; CANTU, D.; BRADFORD, K. J.; DEYNZE, A. V. **Texture diversity in melon (*Cucumis melo* L.): Sensory and physical assessments.** Postharvest Biology and Technology 159, 2020.

FARIAS, M. G.; FAKHOURI, F. M.; DE CARVALHO, C. W. P.; ASCHERI, J. L. R. **Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola (*Malpighia emarginata* D. C.)** Quim. Nova, vol. 35, n. 53, 546-552, 2012.

FEIZY, J.; JAHANI, M.; AHMADI, S. **Antioxidant activity and mineral contents of watermelon peel.** Journal and Food and Bioprocess Engennering. 3(1):35-40, 2020.
FENECH, M. Cytokinesis-blocked micronucleus cytome assay. Nature protocols. v.2, n.5, p. 1084-1104, 2007.

FENECH, M **Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a "cytome" assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death.** Mutat Res 600:58-66, 2006.

FERRARI, G. N.; SUGUINO, E.; MARTINS, A. N.; CAMPAGNOL, R.; FULLANETO, F. DE P.; MINAMI, K. **A cultura da melancia.** Série Produtor Rural n. 54, 2013.

FREGONEZI, N. F.; ALEIXO, N. A.; GOMES, P. S. S.; SILVESTRE, R. B.; DE GRANDIS, R. A.; DA SILVA, P. B.; PAVAN, F. R.; CHORILLI, M.; RESENDE, F. A. **Cyto-genotoxic evaluation of novel anti-tubercular Copper (II) complexes containing isoniazid-based ligands.** Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2020.

GANJI, S. M.; SINGH, H.; FRIEDMAN, M. **Phenolic Content and Antioxidant Activity of Extracts of 12 Melon (*Cucumis melo*) Peel Powders Prepared from Commercial Melons.** Journal of Food Science Vol. 84, Iss. 7, 2019.

GAUTAN, V.; SHARMA, A.; ARORA, S.; BHARDWAJ, R.; AHMAD, A.; AHMAD, B.; AHMAD, P. **In-vitro antioxidant, antimutagenic and cancer cell growth inhibition activities of *Rhododendron arboretum* leaves and flowers.** Saudi Journal of Biological Sciences, 2020.

GOLWALA, D. K.; VAIDYA, S. K.; DHOLWANI, K. K.; PATEL, D. S.; SAHOO, S. **Antioxidant and antimutagenic (Anticlastogenic) activity of alcoholic extract of *Bauhinia variegata* (Linn.) root.** European Journal of Medicinal Plants. 31(2):32-39, 2020.

GUIMARÃES, B. R.; ARAÚJO, A. R. R; PACHECO, M. J. B.; SOUZA, F. J. L.; CARDOSO, A. T. A.; ALMEIDA G. V. **Caracterização e produção dos frutos de meloeiro (*Cucumis melo* L.) influenciados por adubação.** Revista Ibero Americana de Ciências Ambientais, v.11, n.1, p.289- 299, 2020.

HARTMAN, J.L.; PERKINS-VEAZIE, P.; WEHNER, T. C. **Citrulline and Arginine Are Moderately Heritable in Two Red-fleshed Watermelon Populations.** HORTSCIENCE 54(2):200–205. 2019.

HIDDER, C.; TLILI, I.; ILAHY, R. **Nutritional composition and antioxidant properties of fruits and vegetables. Watermelon.** Chapter 32, pag. 515-531, 2020.

ILYASOV, I. R.; BELOBORODOV, V. L.; SELIVANOVA, I. A.; TEREKHOV, R. P. **ABTS/PP Decolorization assay of antioxidant capacity reaction pathways.** Int. J. Mol. Sci. 21,1131, 2020.

ISO10993-12. **Biomedical evaluation of medicine devices – Part 12: Sample preparation and reference material.** Junho, 2020.

ITTIYAVIRAH, S. P.; GEORGE, A.; SANTHOSH, A. M.; KURIAN, S. T.; PAPPACHAN, P.; JACOB, G. **Studies of citotoxic potential of aqueous fruit extract of *Cucumis melo* Linn in prostate cancer cell lines PC-3 using MTT and Neutral red assay.** IRANIAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY & THERAPEUTICS vol. 13. no. 1, 19-25. Jan, 2014.

JAYAPRAKASHA, G. K.; PATIL, B. S. **A metabolomics approach to identify and quantify the phytochemicals in watermelons by quantitative HNMR.** Talanta, 2016.

KARKI, S.; KIM, H.; NA, S. J.; SHIN, D.; JO, K.; LEE, J. **Thin films as na emerging platform for drug delivery.** Asian Journal of Pharmaceutical Sciences, 2016.

KOMANE, B.; VERMAAK, I., KAMATOU, G.; SUMMERS, B.; VILJOEN, A. **The topical efficacy and safety of *Citrullus lanatus* seed oil: A short-term clinical assessment.** South African Journal of Botany 112, 466–473, 2017.

LESTER G. E. **Antioxidant, sugar, mineral, and phytonutrient concentrations across edible fruit tissues of orange-fleshed honeydew melon (*Cucumis melo* L.)** Journal of Agricultural and Food Chemistry, v. 56, n. 10, p. 3694-3698, 2008.

LI, W.; ZHOU, J.; XU, Y. **Study of the in vitro cytotoxicity testing of medical devices (Review)** Biomedical Rreports 3: 617-620, 2015.

LIRA, W. M.; DOS SANTOS, F. V.; SANNOMIYA, M.; RODRIGUES, C. M.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. **Modulatory effect of *Byrsonima basiloba* extracts on the mutagenicity of certain direct and indirect-acting mutagens in *Salmonella typhimurium* assays.** J Med Food, v. 11, n. 1, p. 111-119, 2008.

LOPES, J. C. **Avaliação da atividade citotóxica, antitumoral, antimutagênica, recombinogênica e genotóxica do [Cu(dox)(phen)]+2.** 2019. 67 fls. Tese (Doutorado em Biotecnologia) – Universidade Federal de Uberlândia – MG.

LIM, H. B., LEE, H. R. **Safety and biological activity evaluation of *Uncaria rhynchophylla* ethanolic extract.** Drug and Chemical Toxicology, 1–12, 2020.

MALLEK-AYADI, S., BAHLOUL, N., KECHAOU, N. **Characterization, phenolic compounds and functional properties of *Cucumis melo* L. peels.** Food Chemistry, 221, 1691–1697, 2017.

MALLEK-AYADI, S.; BAHLOUL, N.; KECHAOU, N. **Phytochemical profile, nutraceutical potential and functional properties of *Cucumis melo* L. seeds.** Research Group of Agri-Food processing Engineering, 2018.

MALIK S.; KAUR K.; PRASAD S.; JHA N. K.; KUMAR V. **Uma revisão em perspectiva sobre os recursos das plantas medicinais para seus potenciais antimutagênicos.** Ciência Ambiental e Pesquisa da Poluição, v. in prelo, p. 1-16, 2021.

MANIVANNAN A.; LEE E.; HAN K.; LEE H.; KIM D. **Potenciais nutraceuticos versáteis da melancia - uma fruta modesta carregada de fitoquímicos farmacêuticamente valiosos.** Journal Molecules, v. 25, n. 22, p. 1-15, 2020.

MAOTO, M. M.; BESWA, D.; JIDEANI, A. I. O. **Watermelon as a potential fruit snack.** International Journal of Food Properties, 22:1, 355-370, 2019.

MARON, D. M.; AMES, B. N. **Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity test.** Mutat Res, v. 113, n. 3-4, p. 173 - 215, 1983.

MESSAOUDI, S.; TEBIBEL, S.; BELADJILA, A. K.; TOUHAMI, F. K.; KABOUCHE, Z. **Atividades anti-hiperlipidêmicas, anti-inflamatórias e antioxidantes de *Citrullus lanatus*.** World J Environ Biosci, 8, 1:100-106, 2019.

MINH, N. P.; PHAM, V. T.; NHUNG, V. T. H.; TRANG, N. T. T.; SANG, T. T. **Effectiveness of Carrageenan Coating to Extend Shelf Life of Watermelon (*Citrullus lanatus*) Fruit during Storage.** J. Pharm. Sci. & Res. Vol. 11(4), 1393-1396, 2019.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. **The Ames *Salmonella*/microsome mutagenicity assay.** Mutat Res, v. 455, n. 1-2, p. 29 - 60, 2000.

MOSMANN, T. **Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays.** Journal of Immunological methods, v.65, p.55-63, 1983.

MULLER, N.G.; FASOLO, D.; PINTO, F.P.; BERTÊ, R.; MULLER, F.C. **Potencialidades fitoquímicas do melão (*Cucumis melo* L.) na região Noroeste do Rio Grande do Sul – Brasil.** Rev. Bras. Pl. Med., Campinas, v.15, n.2, p.194-198, 2013.

NARANCIC, T.; CERRONE, F.; BEAGAN, N.; O'CONNOR, K. E. **Recent advances in Bioplastics: application and biodegradation.** *Polymers* 2020, 12, 920

NASIRU, A.; OLUWASEGUN, A. **Phytochemical, nutritional and amino acid composition of *Citrullus lanatus* (Cucurbitaceae) seeds cultivated in South-South Nigeria.** *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry* 8(3): 3738-3740, 2019.

NEIGI, P. S.; JAYAPRAKASHA, G. K.; JENA, B. S: **Antioxidant and antimutagenic activities of pomegranate peel extracts.** *Food Chem*, v. 80, p. 393 – 397, 2003.

NEGLO, D.; TETTEY, C. O.; ESSUMAN, E. K.; KORTEI, N. K. BOAKYE, A. A.; HUNKPE, G.; AMARH, F.; KWASHIE, P. DEVI, W. S. **Comparative antioxidant and antimicrobial activities of the peels, rind, pulp and seeds of watermelon (*Citrullus lanatus*) fruit.** *Scientific African*. 11, 2021.

OECD *Test No. 487: In Vitro Mammalian Cell Micronucleus Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2016.

OECD *Test No. 471: Bacterial Reverse Mutation Test, OECD Guidelines for the Testing of Chemicals*, Section 4, OECD Publishing, Paris, 2020.

OGADINMA, I.; NWAFOR, C. A.; SAMUEL, B. **Tendência hepatoterapêutica de *Citrullus lanatus* Extrato Metanólico de Casca em Marcadores de Fígado em Macho Ratos Wistar.** *Jornal Asiático de Pesquisa Avançada e Relatórios* 4 (1): 1-10, 2019.

OSINUBI, A. D.; BANJOKOL, O. O.; ANSELM, O. H.; AKINRINOLA, O. M.; OSOFODUNRIN, A. **Comparative Effects of Drying Methods on Phytochemical Contents and Anti-Microbial Activities of Watermelon (*Citrullus Lanatus*) Seed and Rind.** *J. Chem Soc. Nigeria*, Vol. 45, No. 1, pp 70 – 78, 2020.

PEREIRA, G. G.; GUTERRES, S. S.; BALDUCCI, A. G.; COLOMBO, P. SONVICO, F. **Polymeric films loaded with vitamin E and Aloe vera for topical application in the treatment of burn wounds.** *BioMed Research International*, 2014.

PINTER E.; RAINER B, CZERNY T, RIEGEL E, SCHILTER B, MARIN-KUAN M, TACKER M. **Evaluation of the suitability of mammalian *in vitro* assays to assess the genotoxic potential of food contact materials.** *Foods* 9:237, 2020.

PRETTI, P. G.; RAJU, P.N. **Comprehensive Overview of *Cucumis melo*** The Pharma Innovation Journal. 6(10): 181-186, 2017.

RAINER B, MAYRHOFER E, REDL M, DOLAK I, MISLIVECECK D, CZERNY T, KIRCHNAWY C, MARIN-KUAN M, SCHILTER B, TACKER M. **Mutagenicity assessment of food contact material migrates with the Ames MPF assay.** Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess 36:1419-1432, 2019.

RE, R.; PELLEGRINI, N.; PROTEGGENTE, A.; PANNALA, A.; YANG, M.; RICE-EVANS, C. **Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay.** Free Radical Biology & Medicine. Vol. 26, nos 9/10, pp. 1231-1237, 1999.

REN, N.; ATYAH, M.; CHEN, W. Y.; ZHOU, C. H. **The various aspects of genetic and epigenetic toxicology: testing methods and clinical applications.** Journal of Translate Medicine. 15:110, 2017.

RESENDE, F. A.; ALMEIDA, C. P. S.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. **Differences in the hydroxylation pattern of flavonoids alter their chemoprotective effect against direct- and indirect-acting mutagens.** Food Chemistry 155 (2014), 251-255.

RESENDE, F. A.; CAMPOS, D. L.; DA SILVA, V. C.; DE GRANDIS, R. A.; SOUZA, L. P.; JUNIOR, C. S. L.; DA ROCHA, C. Q.; DOS SANTOS, L. C.; VILEGAS, W.; VARANDA, E. A. **Mutagenicity and chemopreventive activities of *Astronium* species assessed by Ames test.** Regulatory Toxicology and Pharmacology 72 (2015) 506–513.

RISS, T. L.; MORAVEC, R. A.; NILES, A. L.; DUELLMAN, S.; BENINK, H.; WORZELLA, T. J.; MINOR, L. **Cell viability assays.** In Assay guidance manual, 2016.

ROLIM, P. M.; FIDELIS, G. P.; PADILHA, C. E. A.; SANTOS, E. S. ROCHA, H. A. O.; MACEDO, G. R. **Phenolic profile and antioxidant activity from peels and seeds of melon (*Cucumis melo* L. var. *reticulatus*) and their antiproliferative effect in cancer cells.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 51(4), 2018.

RUFINO, M. S. M.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; MORAIS, S. M.; SAMPAIO, C. G.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; SAURA-CALIXTO, F. D. **Metodologia Científica: Determinação da Atividade Antioxidante Total em Frutas pela Captura do Radical Livre ABTS^{•+}.** Comunicado Técnico online. 2007. Disponível em:

<https://ainfo.cnptia.embrapa.br/digital/bitstream/CNPAT/10225/1/Cot_128.pdf>. Acesso em: 12 abril 2021.

SANTOS, M. C. **Análises citogenéticas em variedades comerciais de meloeiros (*Cucumis melo* L.)** 2016. 60 fls. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal), Universidade de Santa Cruz – Bahia, 2016.

SCHWARZ, D.; KISSELEV P.; CASCORBI I.; SCHUNCK WH; ROOTS I. **Differential metabolism of benzo[a]pyrene and benzo[a]pyrene-7,8-dihydrodiol by human CYP1A1 variants**. Carcinogenesis, v. 22, p. 453 - 459, 2001.

SICA DE TOLEDO, L. DE A., BAVATO, M. I., ROSSETO, H. C., CORTESI, R., BRUSCHI, M. L. **Pharmaceutical films made from the waste material from the preparation of propolis extracts: development and characterization**. Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences, 51(4), 847–859, 2015.

SIONKOWSKA, A. **The potential of polymers from natural sources as components of the blends for biomedical and cosmetic applications**. Pure and Applied Chemistry, 87(11-12), 1075–1084, 2015.

SŁOCZYŃSKA, K., POWROŹNIK, B., PEKALA, E., & WASZKIELEWICZ, A. M. **Antimutagenic compounds and their possible mechanisms of action**. Journal of Applied Genetics, 55(2), 273–285, 2014.

SOMMER, S., BURACZEWSKA, I., & KRUSZEWSKI, M. **Micronucleus Assay: The State of Art, and Future Directions**. International Journal of Molecular Sciences, 21(4), 1534, 2020.

TLILI, I.; HDIDDER, C.; LENUCCI, M. S.; ILAHY, R.; JEBARI, HAGER.; DALESSANDRO, G. **Bioactive compounds and antioxidant activities during fruit ripening of watermelon cultivars**. Journal of Food Composition and Analysis 24, 923–928, 2011.

UHL, M., ECKER, S., KASSIE, F., LHOSTE, E., CHAKRABORTY, A., MOHN, G., & KNASMÜLLER, S. **Effect of chrysin, a flavonoid compound, on the mutagenic activity of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4,5- b] pyridine (PhIP) and benzo(a)pyrene (B(a)P) in bacterial and human hepatoma (HepG2) cells**. Archives of Toxicology, 77(8), 477–484, 2003.

UMBUZEIRO, G.A.; VARGAS, V.M.F. **Teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurium* (Teste de Ames) como indicador de carcinogenicidade em**

potencial para mamíferos. In: RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Org.). *Mutagênese Ambiental*. Canoas: Ulbra, 2003.p.81-112.

VOLOBUEVA, A.; ZHANG, D.; GRECHKO, A. V.; OREKHOV, A. N. **Foam cell formation and cholesterol trafficking and metabolismo disturbances in atherosclerosis.** *Cor et vasa*, 2018.

XIA Y.; CHENG S.; HE J.; LIU X.; TANG Y.; YUAN H.; HE L.; LU T.; TU B.; WANG Y. **Efeitos da exposição subcrônica ao benzo [a] pireno (B [a] P) na aprendizagem e na memória, e neurotransmissores em ratos Sprague-Dawley machos.** *NeuroToxicology*, v. 32, n. 2, p. 188-198, 2011.

WANG, Y.; ZHANG, X.; BAI, Y.; LI, W.; LI, X.; XING, X.; WANG, C.; GAO, L.; YOGI, M.; SWAMY, M. K.; DUPADAHALLI, K.; RUDRAMURTHY, G. R.; PUROSHOTHAM, B.; ROHIT, K. C.; FU, J. **Anticancer and antibacterial activities of Silver Nanoparticles (AgNPs) synthesized from *Cucumis melo* L.** *Journal of Nanoscience and Nanotechnology* Vol. 20, 4143 – 4, 2020.

ZEB A. **Phenolic Profile and Antioxidant Activity of Melon (*Cucumis Melo* L.) Seeds from Pakistan.** *Foods*, v. 5, n. 67, p. 1-7, 2016.

ZHANG X.; BAI Y.; WANG Y.; WANG C.; FU J.; GAO L.; LIU Y.; FENG J.; SWAMY M. K.; YOGI M.; RUDRAMURTHY G. R.; PURUSHOTHAM B.; DENG Y. **Anticancer Properties of Different Solvent Extracts of *Cucumis melo* L. Seeds and Whole Fruit and Their Metabolite Profiling Using HPLC and GC-MS.** *Biomed Research International*, v. 2020, p. 1-9, 2020.