

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

Mariana Rodrigues Barreto

ESTUDO DO POTENCIAL TOXICOGENÉTICO DE BIOFILMES POLIMÉRICOS
DE *ALLIUM CEPA* L.

Araraquara, SP

2018

Mariana Rodrigues Barreto

**ESTUDO DO POTENCIAL TOXICOGENÉTICO DE BIOFILMES POLIMÉRICOS
DE *ALLIUM CEPA* L.**

Dissertação 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 Dr^a Flávia Ap. Resende Nogueira

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

Araraquara, SP

2018

FICHA CATALOGRÁFICA

B263e Barreto, Mariana Rodrigues

Estudo do potencial toxicogenético de biofilmes poliméricos de *Allium cepa* L./Mariana Rodrigues Barreto. – Araraquara: Universidade de Araraquara, 2018.

58f.

Dissertação (Mestrado) - Curso de Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal – Universidade de Araraquara

Orientador: Profa Dra. Flávia Aparecida Resende Nogueira

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

1. Embalagens comestíveis. 2. Mutagenicidade. 3. Citotoxicidade. 4. Teste de Ames. 4. Teste do Citoma. I. Título.

CDU 577.1:66



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
BIOTECNOLOGIA EM MEDICINA REGENERATIVA
E QUÍMICA MEDICINAL – PPGB-MRQM



MARIANA RODRIGUES BARRETO

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

Araraquara, 25 de junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD (Coorientador)
Universidade de Araraquara - UNIARA


Prof. Dr. CLÓVIS AUGUSTO RIBEIRO
Instituto de Química de Araraquara/UNESP


Drª ISABEL CRISTIANE DA SILVA
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara/UNESP.

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho aos meus pais, Evaldo e Maria Inês, por me concederem todo suporte necessário nessa caminhada, sendo meus alicerces, sempre me apoiando e incentivando a ir em busca dos meus sonhos, contribuindo para que mais uma etapa fosse concluída.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por me tornar capaz, sendo sempre meu refúgio e proteção!

À minha orientadora Prof^a Dr^a Flávia Aparecida Resende Nogueira, pela oportunidade dada para a realização deste trabalho, que compartilhou as suas ideias, conhecimento e experiências e me proporcionou um grande aprendizado e crescimento. Gostaria de expressar meu reconhecimento e admiração pela sua competência profissional e gratidão pela sua amizade. Muito obrigada pela paciência e dedicação.

Aos meus professores de Pós-Graduação (Mestrado), por todas as aulas ministradas e experiências transmitidas, que foram responsáveis pelos meus conhecimentos e amadurecimento profissional.

Ao grupo de pesquisa QUIMMERA que me proporcionou a realização deste trabalho, oferecendo todo o suporte necessário e experiência.

Ao Dr. Diógenes dos Santos Dias da empresa BioSmart Nanotechnology que em parceria com o grupo de pesquisa BioPolMat da Universidade de Araraquara, produziu e forneceu os filmes para a realização deste trabalho.

À minha família que sempre esteve presente em todos os momentos, me apoiando em minhas escolhas e me dando forças para ir além, vibrando com as minhas conquistas e me amparando nos momentos difíceis.

Aos meus amigos, que são fundamentais em minha vida. Agradeço aos velhos e novos amigos por terem me apoiado e ficado ao meu lado nas horas que mais precisei.

EPÍGRAFE

“O sucesso nasce do querer, da determinação e persistência em se chegar a um objetivo. Mesmo não atingindo o alvo, quem busca e vence obstáculos, no mínimo fará coisas admiráveis [...]”

José de Alencar

RESUMO

BARRETO, Mariana Rodrigues. **Estudo do potencial toxicogenético de biofilmes poliméricos de *Allium cepa* L.** 2018. Defesa (Mestrado em Biotecnologia em Medicina Regenerativa e Química Medicinal) Universidade de Araraquara.

A ingestão de alimentos é uma das principais vias de exposição do homem a diferentes compostos mutagênicos/carcinogênicos, visto que uma mistura complexa de agentes químicos é encontrada em sua dieta. A fim de minimizar os problemas ambientais causados pelo descarte inadequado e uso excessivo de plásticos, diversas empresas buscam por embalagens comestíveis. Entretanto, para que possam fazer parte do alimento a ser consumido, os materiais empregados em suas formulações devem ser atóxicos e seguros para o consumo humano. Dessa forma, o objetivo do presente estudo foi elucidar o perfil citotóxico e mutagênico de filmes poliméricos de *Allium cepa* L. para o uso como embalagens comestíveis, a fim de se assegurar e esclarecer sua inocuidade quanto ao material genético. Os filmes foram produzidos e fornecidos pelo Dr. Diógenes dos Santos Dias da empresa BioSmart Nanotechnology em parceria com o grupo de pesquisa BioPolMat da Universidade de Araraquara. Para avaliação citogenotóxica foram preparados eluatos das amostras como recomendado pelo FDA (2002). A atividade citotóxica foi avaliada frente às células HepG2 (ATCC HB-8065TM), de carcinoma hepatocelular humano e GM-07492 de fibroblastos normais de pulmão humano, utilizando-se como substância reveladora o MTT (metil tiazolil tetrazólio). A mutagenicidade foi avaliada por meio dos ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) e do Citoma. O teste de Ames foi realizado segundo a metodologia de pré-incubação, na presença e ausência de ativação metabólica, nas cepas TA98, TA97a, TA100 e TA102 de *S. typhimurium*. Já o ensaio do citoma foi realizado em células HepG2, utilizando como parâmetros de análise, a frequência de micronúcleos, pontes nucleoplasmáticas e brotamentos nucleares. De acordo com os resultados, o padrão de citotoxicidade dos filmes lavado e não lavado frente à linhagem HepG2 foi semelhante; ambos induziram uma diferença estatisticamente significativa nas maiores concentrações avaliadas (100, 50 e 25%) comparado ao controle negativo. Com relação às células GM-07492, a diferença foi mais acentuada, com uma redução estatisticamente significativa nos tratamentos de 100, 50, 25 e 12,5% para o filme não lavado, enquanto que para o filme lavado, o potencial citotóxico foi observado somente nas concentrações de 100 e 50%. Com relação a atividade mutagênica, os filmes não foram capazes de aumentar estatisticamente as frequências dos biomarcadores para danos gênicos (teste de Ames) e cromossômicos (teste do Citoma) nas concentrações testadas, indicando ausência de potencial mutagênico. Foram observados somente indícios de mutagenicidade para os filmes não lavados (índice de mutagenicidade máximo de 1,9), o que sugere cautela no seu uso. A detecção de genotoxicidade é altamente recomendável de modo a evitar o risco de exposição genotóxica a mutagênicos e agentes cancerígenos. Esses resultados são extremamente relevantes, pois contribuem para dados valiosos sobre o uso seguro dos filmes de *Allium cepa* L. para fins comerciais. No entanto, novas investigações que explorem outros mecanismos de mutagênese devem ser realizadas.

Palavras-chave: embalagens comestíveis, mutagenicidade, citotoxicidade, Teste de Ames, Teste do Citoma.

ABSTRACT

BARRETO, Mariana Rodrigues. **Study of the toxicogenic potential of polymeric biofilms of *Allium cepa* L.** 2018. Defense (Master degree in Biotechnology in Regenerative Medicine and Medicinal Chemistry) University of Araraquara.

Food intake is one of man's main routes of exposure to different mutagenic / carcinogenic compounds, since a complex mixture of chemical agents is found in it's diet. In order to minimize environmental problems caused by improper disposal and excessive use of plastics, several companies are looking for edible packaging. However, in order to be part of the food to be consumed, the materials used in its formulations must be non-toxic and safe for human consumption. Thus, the objective of the present study was to elucidate the cytotoxic and mutagenic profile of polymer films of *Allium cepa* L. for use as edible packaging, in order to ensure and clarify their innocuity regarding the genetic material. The films were produced and supplied by Dr. Diógenes dos Santos Dias of the company BioSmart Nanotechnology in partnership with the research group BioPolMat of the University of Araraquara. For cytogenotoxic evaluation, sample eluates were prepared as recommended by the FDA (2002). The cytotoxic activity was assessed against human Hepatocyte HepG2 (ATCC HB-8065™) cells and GM-07492 from normal human lung fibroblasts using MTT (methyl thiazole tetrazolium) as the developing substance. Mutagenicity was assessed by reverse gene mutation assays with *Salmonella typhimurium* (Ames test) and Cytome. The Ames test was performed according to the preincubation methodology, in the presence and absence of metabolic activation, in TA98, TA97a, TA100 and TA102 strains of *S. typhimurium*. The cytome assay was performed on HepG2 cells using the micronuclei frequency, nucleoplasmic bridges and nuclear budding as the parameters of analysis. According to the results, the pattern of cytotoxicity of the washed and unwashed films against the HepG2 lineage was similar; both induced a statistically significant difference in the highest concentrations evaluated (100, 50 and 25%) compared to the negative control. With regard to GM-07492 cells, the difference was more pronounced, with a statistically significant reduction in 100, 50, 25 and 12.5% treatments for the unwashed film, whereas for the washed film, the cytotoxic potential was observed only at concentrations of 100 and 50%. Regarding the mutagenic activity, the films were not able to statistically increase the frequencies of the biomarkers for genetic damage (Ames test) and chromosome (Cytome test) at the tested concentrations, indicating absence of mutagenic potential. Only evidence of mutagenicity was observed for unwashed films (maximum mutagenicity index of 1.9), which suggests caution in its use. The detection of genotoxicity is highly recommended in order to avoid the risk of genotoxic exposure to mutagens and carcinogens. These results are extremely relevant as they contribute to valuable data on the safe use of *Allium cepa* L. films for commercial purposes. However, further investigations exploring other mutagenesis mechanisms must be performed.

Key words: edible packaging, mutagenicity, cytotoxicity, Ames test, Cytome test.

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

AFB1 – Aflatoxina B1

ANOVA – Análise de Variância

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASTM – *American Society for Testing and Materials*

ATCC – Coleção de culturas celulares americana (*American Type Culture Collection*)

BR – Brotos nucleares

°C – Grau Celsius

Caco-2 - Células de adenocarcinoma humano

CHO - Células de ovário de hamster chinês

cm² - Centímetro quadrado

CN – Controle negativo

CO₂ - Dióxido de carbono

CP – Controle positivo

DMEM – *Dulbecco's modification of Eagle's medium*

DMSO – Dimetilsulfóxido

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DP – Desvio padrão

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético (*Ethylenediamine tetraacetic acid*)

EUA – Estados Unidos da América

FCF – Faculdade de Ciências Farmacêuticas

FDA – *Food and Drug Administration* (Administração de Comidas e Remédios)

µg – Micrograma

GM-07492 – Células normais de pulmão humano

GRAS – *Generally Recognized as Safe*

HepG2 – Células de câncer do fígado

IDN - Índice de Divisão Nuclear

IM – Índice de Mutagenicidade

Kgf – Quilograma-força

μL – Microlitro

μM – Micromolar

mg – Miligrama

mL – Mililitro

MMS – Metilmetanosulfonato

MN - Micronúcleo

MTT - brometo de 3- (4,5- dimetil- 2- tiazolil) - 2,5- difenil- 2H- tetrazólio ou brometo de metiltiazolildifenil- tetrazólio

NADP - Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato

nm - Nanômetro

PBS - Tampão Salina Fosfato (*Phosphate Buffered Saline*)

PNP – Pontes nucleoplasmáticas

PTSO - Propil-tiosulfinato (PTSO)

QUIMMERA – Laboratório de Química Medicinal e Medicina Regenerativa

Rpm – Rotação por minuto

RTI - *Research Triangle Institute*

S9 – Fração microssomal de fígado de ratos tratados com Aroclor 1254

SBF – Soro Bovino Fetal

SPME - *Solid phase microextraction*

TA97a, TA98, TA100 e TA102 – Cepas de *Salmonella typhimurium*

TK6 – Linfoblasto humano

UNESP – Universidade Estadual Paulista

UPLC - *Ultra-performance liquid chromatography*

USA – *United States of America* (Estados Unidos da América)

V79 - Fibroblastos de pulmão de hamster chinês

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Estrutura molecular dos sais MTT e formazana.....pág. 20
- Figura 2.** Micronúcleo em célula binucleada.....pág. 21
- Figura 3.** Possíveis destinos das células expostas a agentes citotóxicos e/ou genotóxicos após bloqueio de citocinese.....pág. 23
- Figura 4.** Filmes de Cebola (*Allium cepa* L.).....pág. 28
- Figura 5.** Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações dos extratos dos filmes lavados e não lavados de *Allium cepa* L.....pág. 37
- Figura 6.** Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células GM-07492 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações dos extratos dos filmes lavados e não lavados de *Allium cepa* L.....pág. 38
- Figura 7.** Alterações cromossômicas: Micronúcleos (A), pontes nucleoplasmáticas (B) e brotos nucleares (C) amplitude 1000x, células HepG2 coradas com *Acridine Orange*.....pág. 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características genotípicas e fenotípicas das cepas padrões sugeridas para o Teste de Ames utilizadas no estudo.....pág. 25

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de Micronúcleos (MNs), Pontes Nucleoplasmáticas (PNPs), Brotos Nucleares (BRs) e Índice de Divisão Nuclear (IDN) de culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações dos extratos dos filmes de cebola lavado e não-lavado.....pág.40

Tabela 3. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com várias concentrações do extrato do filme de cebola não-lavado, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....pág. 42

Tabela 4. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com várias concentrações do filme de cebola lavado, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.....pág. 43

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	15
1.1. Genêro <i>Allium</i>	15
1.2. Embalagens biodegradáveis	17
1.3. Citotoxicidade.....	18
1.4. Mutagenicidade	20
1.4.1. Ensaio do Citoma	21
1.4.2. Teste de Ames	24
2. OBJETIVOS.....	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. MATERIAL E MÉTODOS	27
3.1. Obtenção das amostras	27
3.2. Preparação da amostra para os testes.....	28
3.3. Linhagens celulares	29
3.4. Tripsinização das culturas celulares	29
3.5. Preparo dos estoques celulares	30
3.6. Descongelamento dos estoques celulares	30
3.7. Ensaio de viabilidade celular pelo MTT.....	30
3.8. Mutagenicidade	31

3.8.1. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (citoma)	31
3.8.2. Teste de Ames	33
3.9. Análise estatística	34
4. RESULTADOS	36
4.1. Citotoxicidade.....	36
4.2. Mutagenicidade	39
5. DISCUSSÃO.....	44
6. CONCLUSÃO.....	50
7. REFERÊNCIAS.....	51

1. INTRODUÇÃO

1.1. Gênero *Allium*

O gênero *Allium* é o maior e mais representativo da família Alliaceae e compreende cerca de 450 espécies, amplamente distribuídas no hemisfério norte. Além dos bens conhecidos alho e cebola, várias outras espécies são amplamente cultivadas, como alho-poró (*Allium porrum* L.), cebolinha (*Allium fistulosum* L.), chalota (*Allium ascalonicum* Hort.), alho silvestre (*Allium ursinum* L.), alho elefante (*Allium ampeloprasum* L. var. *ampeloprasum*), cebolinha chinesa (*Allium tuberosum* L.), entre outras (LANZOTTI, 2006).

Essas espécies apresentam uma rica fonte de fitonutrientes de potenciais benefícios à saúde para o tratamento de diabetes tipo 2, doença coronariana, obesidade, hipercolesterolemia, hipertensão, catarata e distúrbios do trato gastrointestinal (MARTINS *et al.*, 2016; LANZOTTI, 2006; BERETTA *et al.*, 2017).

Outras propriedades biológicas interessantes, com destaque para a cebola, são as atividades antioxidantes, anticarcinogênicas, antimutagênicas, antiasmáticas, imunomoduladoras, antimicrobianas e prebióticas (GRIFFITHS *et al.*, 2002; CHO *et al.*, 2016).

Recentemente, Cho *et al.* (2016) avaliaram o efeito protetor do extrato de cebola na citotoxicidade e genotoxicidade induzida por bleomicina, um agente radiomimético, em linfócitos humanos e observaram um aumento significativo na viabilidade celular em linfócitos tratados com extrato de cebola, em seguida, expostos a bleomicina, em comparação com células tratadas com bleomicina isoladamente, bem como uma redução na frequência de micronúcleos e danos ao DNA, demonstrando um efeito antimutagênico da amostra avaliada.

A maioria dos efeitos biológicos do *Allium* está relacionada aos compostos contendo enxofre, “tio-sulfanatos”, típicos dessas espécies vegetais e responsáveis por seu aroma e sabor pungentes característicos. No entanto, estes metabólitos são relativamente

instáveis. Em comparação com os compostos de enxofre, outros constituintes, saponinas e flavonóides encontrados em *Allium* apresentam as vantagens de não serem pungentes e mais estáveis às condições de cozimento e armazenamento (LANZOTTI, 2006). Estes compostos, nomeados com os termos “nutracêuticos” ou “fitoquímicos”, são classificados como micronutrientes não essenciais e capazes de contribuir para a homeostase humana, desempenhando um papel na manutenção da saúde (ZEISEL, 1999; HENRY, 1999).

Com uma variedade de finalidade, muitas vezes são consumidos crus ou após o processamento na forma de óleo, extrato ou pó, a fim de preservar os produtos aumentando sua vida útil ou para reduzir algumas características desagradáveis. Diferenças acentuadas na composição química e no conteúdo de seus compostos bioativos são observadas durante o processamento (MARTINS *et al.*, 2016; FARAG *et al.*, 2017).

Dentre as espécies, a cebola (*Allium cepa* L.) está entre as mais antigas plantas cultivadas, usadas para fins culinários, além de seus efeitos terapêuticos (MARTINS *et al.*, 2016). São cultivadas na maioria das zonas climáticas ao redor do mundo, de climas tropicais a frios, sendo que as principais áreas de produção são China, Índia, Estados Unidos, Rússia, Turquia e Irã. O consumo per capita difere muito entre países e áreas, no entanto, o consumo de cebola está aumentando em todo o mundo. Esta espécie pode ser diferida quanto a forma do bulbo, cor das escamas externas (amarelo, vermelho, branco), pungência (de leve e doce a muito picante), vida de armazenamento do bulbo e teor de matéria seca. Além disso, sua constituição química também pode variar consideravelmente entre os cultivos (SLIMESTAD *et al.*, 2007).

De acordo com a literatura, a cebola tem aproximadamente 90% de água com alto teor de fibra dietética e açúcares. Em termos de vitaminas e minerais, a cebola apresenta baixo teor de sódio e alto teor de vitamina B6, ácido fólico, cálcio, magnésio, fósforo e potássio. Além disso, tem baixo teor de lipídios e entre o conteúdo de aminoácidos apenas a arginina e o ácido glutâmico são notáveis (SULERIA *et al.*, 2013). Dois subgrupos de flavonóides são encontrados na cebola, as antocianinas, que conferem uma cor vermelha a roxa e os flavonóides, como a quercetina e seus derivados, responsáveis pelas peles amarelas e marrons de diferentes variedades (GRIFFITHS *et al.*, 2002; SULERIA *et al.*, 2013; FARAG *et al.*, 2017), sendo estes últimos, os predominantes. Também apresentam altas concentrações de sulfóxidos de cisteína (LEE *et al.*, 2011; SULERIA *et al.*, 2013;

WERMES *et al.*, 2017; FARAG *et al.*, 2017), responsáveis pela pungência, bem como carboidratos não estruturais como glicose, frutose, sacarose e frutanos de baixo peso molecular. A literatura também relata saponinas e peptídeos, compostos que também contribuem potencialmente para a saúde (SULERIA *et al.*, 2013; LANZOTTI, 2006).

Considerando o alto valor nutricional e terapêutico, a produção de filmes e recobrimentos a partir de cebola para aplicação como embalagem é interessante. No entanto, apesar de ser uma proposta inédita e inovadora, os filmes de cebola para o desenvolvimento de embalagens comestíveis devem ser avaliados antes de serem considerados atóxicos e seguros para o consumo humano.

1.2. Embalagens biodegradáveis

O grande consumo ao longo dos anos de produtos plásticos constituídos por polímeros não biodegradáveis vem causando consideráveis problemas ambientais, pelo fato de possuírem elevada resistência a degradação demorando centenas de anos para serem assimilados por microrganismos e se decomporem. Para minimizar os impactos ambientais causados pelo descarte inadequado de produtos fabricados com plásticos, pesquisadores vêm buscando alternativas ecologicamente viáveis (BRITO *et al.*, 2011). Uma solução recentemente encontrada é o desenvolvimento de filmes e embalagens biodegradáveis a partir de polímeros provenientes de fontes renováveis, a qual apresenta grande potencial de expansão, devido sua viabilidade técnica e econômica (FARIAS *et al.*, 2012).

Segundo a ASTM (*American Society for Testing and Materials*), uma embalagem biodegradável é a aquela capaz de se decompor em dióxido de carbono, água, metano, compostos inorgânicos ou biomassa, sendo o mecanismo predominante de decomposição a ação enzimática de microrganismos (ASTM, 2005).

Neste contexto, existe um interesse crescente da indústria alimentícia no desenvolvimento de filmes comestíveis baseados em biopolímeros, devido ao grande potencial desses filmes em melhorar e manter a qualidade do alimento. Os filmes

comestíveis podem servir como suporte de aditivos alimentares, incluindo agentes antioxidantes, vitaminas, corantes, agentes antimicrobianos e aromas, melhorando a integridade do alimento (FARIAS *et al.*, 2012). Além disso, os materiais empregados em suas formulações devem ser atóxicos e seguros para o consumo humano (*e.g.* considerados GRAS - *Generally Recognized as Safe* - pela *Food and Drug Administration* estadunidense).

No Brasil, alguns grupos já trabalham nessa linha de pesquisa, um deles está no Laboratório de Embalagem de Alimentos da Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE), onde são desenvolvidos filmes e revestimentos biodegradáveis baseados em polímeros naturais, incluindo amido, alginato, cera de carnaúba, goma de cajueiro, gelatina de peixe, além de polpas de frutas (REINOL, 2015). Adicionalmente, pesquisadores da Embrapa Instrumentação (São Carlos-SP) desenvolveram películas comestíveis de diferentes alimentos como espinafre, mamão, goiaba, tomate; esta técnica permite utilizar outros alimentos como matéria-prima (FREIRE, 2015).

No entanto, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), em resposta às constantes inovações tecnológicas, exige uma comprovação pré-mercado da segurança do uso de determinados alimentos e ingredientes. Isso acontece por meio de estudos toxicológicos que contribuam na identificação de efeitos adversos potenciais e na definição das condições de exposição necessárias para induzir tais efeitos. Os dados obtidos são extremamente relevantes e tem como objetivo proteger a saúde da população e reduzir os riscos associados ao consumo desses produtos (ANVISA, 2013).

1.3. Citotoxicidade

A avaliação da toxicidade consiste em investigar os efeitos nocivos decorrentes das interações de substâncias químicas com o organismo (MINE, 2003), sendo assim, ensaios em sistemas *in vitro* e *in vivo* são realizados antes da aprovação de qualquer novo composto para testes em seres humanos (RANG *et al.*, 2004).

Diversos métodos *in vitro* utilizando-se culturas celulares já foram padronizados; estes são denominados testes de citotoxicidade (ROGERO *et al.*, 2003). Segundo Eisenbrand (2002), a citotoxicidade é a capacidade que um composto possui de induzir morte celular quando entra em contato com uma cultura de células, portanto, são úteis e necessários para definir a citotoxicidade basal, isto é, a habilidade intrínseca de um composto em causar morte celular como consequência de danos às funções básicas celulares por diferentes mecanismos.

Na toxicologia *in vitro*, os sistemas celulares mais empregados incluem: culturas primárias, linhagens imortalizadas, células geneticamente modificadas, células troncos, células em diferentes estágios de diferenciação, co-culturas de diferentes tipos celulares, culturas tridimensionais, amostras de tecidos e sistemas de barreira (ZUCCO *et al.*, 2004; FREITAS, 2010).

Ao longo de vários anos de pesquisa foram estabelecidos parâmetros que podem ser analisados nos ensaios de citotoxicidade, sendo os mais frequentes a inibição da proliferação celular, dano na membrana celular, danos em organelas, alterações morfológicas e redução da função metabólica (DANTAS, 2014; EISENBRAND, 2002).

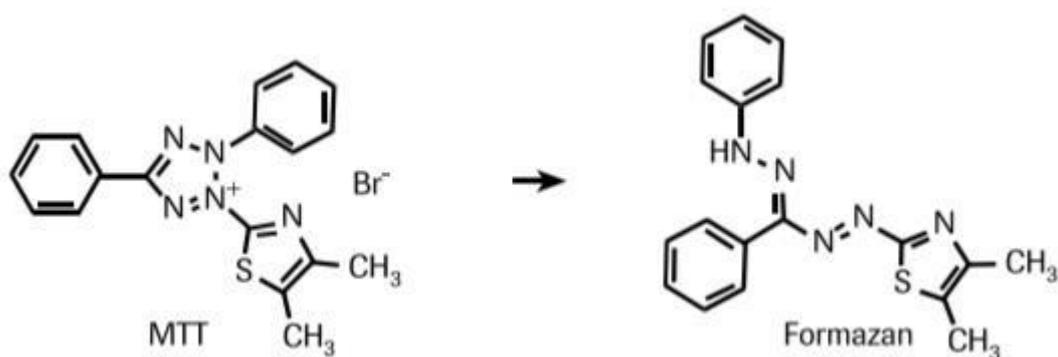
O ensaio colorimétrico do MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil brometo de tetrazólio) desenvolvido por Mosmann (1983) é possivelmente um dos mais versáteis e empregados na literatura. O ensaio detecta somente células vivas e o sinal gerado é dependente do grau de ativação dessas células. O método pode ser usado para medir a citotoxicidade, proliferação ou ativação celular (MOSMANN, 1983).

Células metabolicamente ativas utilizam o MTT, um sal solúvel em água de coloração amarela como substrato e o reduz através da clivagem do anel pela atividade de desidrogenases mitocondriais, presentes e funcionais exclusivamente nestas células vivas a um produto de cor violeta e insolúvel em água, o sal formazan 1-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-3,5-difenilformazan. Dessa forma, a redução do MTT a formazana (**Figura 1**) será diretamente proporcional à atividade mitocondrial e a viabilidade celular (NOZAKI, *et al.*, 2012).

De uma maneira geral, ensaios citotóxicos com diferentes culturas podem ser utilizados com sucesso e possuem como vantagens serem reprodutíveis, rápidos, sensíveis

e financeiramente acessíveis para a execução do estudo da biocompatibilidade *in vitro* (ROGERO *et al.*, 2003).

Figura 1. Estrutura molecular dos sais MTT e formazan.



Fonte: SIGMA ALDRICH. Disponível em: <<http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/biofiles/cell-viability-and-proliferation.html>>

1.4. Mutagenicidade

No seu dia-a-dia, o Homem está exposto a inúmeros agentes biológicos, físicos e químicos, sintéticos ou naturais (VARANDA, 2006) com efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos (ANTUNES *et al.*, 2000).

As mutações podem ser espontâneas causadas por erros de replicação do DNA, danos ao DNA como oxidação e sequências altamente repetitivas ou serem induzidas (GRIFFITHS *et al.*, 2001), podendo ser manifestada como uma alteração herdável em decorrência de mutação em células germinativas e/ou mutações somáticas favorecendo o desenvolvimento de tumores ou outros processos crônicos degenerativos (DEARFIELD *et al.*, 2002)

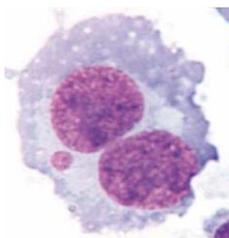
Ainda podem ser classificadas em mutações genômicas (afetam o número de cromossomos da célula), mutações cromossômicas (alteram a estrutura de cromossomos específicos) e mutações gênicas (alteram genes individualmente) (NUSSBAUM *et al.*,

2002). As mutações cromossômicas subdividem-se em mutações estruturais, que correspondem a alterações da morfologia e da estrutura do cromossomo e mutações numéricas quando ocorre durante a meiose. Já as mutações gênicas podem ocorrer por substituição de base única, inserção ou deleção (GRIFFITHS *et al.*, 2001). Assim, são responsáveis por causar múltiplos efeitos os quais, na grande maioria, os resultados são maléficos, como malformações congênitas, envelhecimento celular, teratogênese e carcinogênese (SILVA *et al.*, 2003). Por isso, a avaliação do risco humano através da investigação do potencial que algumas substâncias têm de causar danos no material genético é extremamente importante (OLIVEIRA *et al.*, 2013).

1.4.1. Ensaio do Cítoma

O teste do micronúcleo (MN) é um método utilizado para avaliar danos cromossômicos, pois detecta tanto perda quanto quebra cromossômica (CHEQUER *et al.*, 2009), sendo então um biomarcador para identificação de agentes clastogênicos e aneugênicos (THIERENS & VRAL, 2009). As alterações cromossômicas identificadas neste ensaio são verificadas através da contagem de estruturas circulares envoltas por uma membrana nuclear, chamadas MNs (**Figura 2**), que são formadas por fragmentos cromossômicos ou cromossomos inteiros que se atrasaram durante a anáfase e não foram incorporados aos núcleos das células filhas (BARROS *et al.*, 2005; THIERENS & VRAL, 2009; SCHUNK *et al.*, 2015).

Figura 2. Micronúcleo em célula binucleada

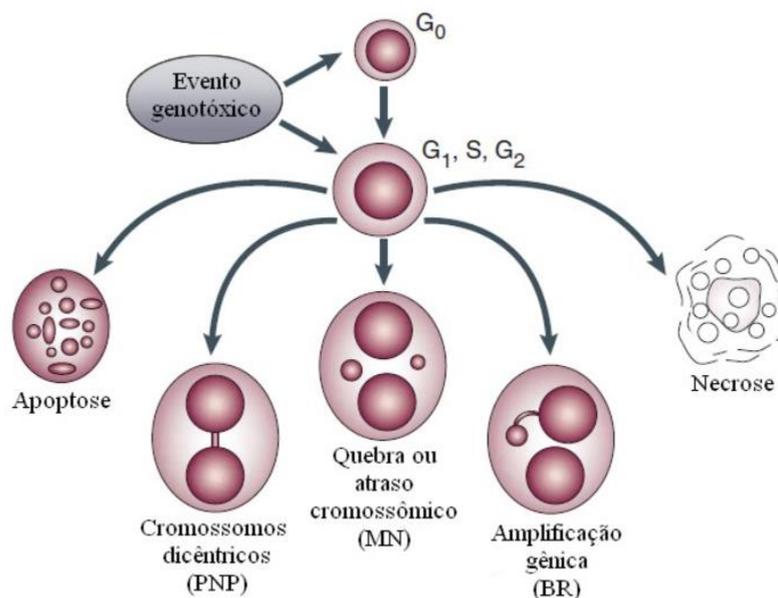


Fonte: FENECH (2007)

A fim de aumentar a sensibilidade do teste na identificação dos danos cromossômicos, é realizado o ensaio do Citoma. Essa metodologia, proposta por Fenech (2007) consiste na adição de citocalasina B, uma substância que atua como inibidor de actina, impedindo a formação do anel contrátil que induz a citocinese. Com isso, células binucleadas são formadas, pois apesar da citocalasina B bloquear a citocinese, a divisão nuclear continua normalmente (FENECH, 2007). Em consequência disso, um acúmulo de células binucleadas a partir de células que passaram por apenas um ciclo de divisão é observado (THIERENS & VRAL, 2009). Dessa maneira, além de MNs, ocasionalmente, pontes nucleoplasmáticas (PNPs), brotos nucleares (BRs), células apoptóticas e células necróticas podem ser observadas (FENECH, 2007) (**Figura 3**).

A expressão de MNs pode ser usada como um marcador substituto de hipometilação no DNA. Já a quantificação de PNPs fornece evidências diretas de rearranjo cromossômico e danos genômicos, que não seriam possíveis apenas utilizando MN como parâmetro. As PNPs podem ser ocasionadas quando cromossomos dicêntricos, originados a partir de quebras erradas no DNA, têm seus centrômeros puxados para polos opostos da célula durante a anáfase, formando pontes anafásicas, que poderão ser visualizadas posteriormente como PNP, ou ainda devido a fusão de telômeros, causada por encurtamento telomérico ou perda de proteínas de cobertura dos telômeros. O processo de formação de BRs ocorre durante a fase S, sendo caracterizados por ter a mesma morfologia que o MN, com a exceção de que ainda estão ligados ao núcleo por uma haste estreita ou larga de material nucleoplasmático, dependendo do estágio do processo de brotamento. Os brotos estão relacionados com o processo de amplificação gênica e são classificados como um dos mecanismos de formação dos MNs, apesar de a duração desse processo ser desconhecida (FENECH, 2007).

Figura 3. Possíveis destinos das células expostas a agentes citotóxicos e/ou genotóxicos após bloqueio de citocinese



Fonte: adaptado de FENECH (2007)

Esse teste pode ser realizado por meio de cultura celular com diversos tipos celulares de roedores, CHO (células de ovário de hamster chinês) e V79 (fibroblastos de pulmão de hamster chinês), ou humanos, como, por exemplo, TK6 (linfoblasto humano) e HepG2 (carcinoma hepatocelular humano), ou ainda em experimentos *in vivo* utilizando células hematopoiéticas de roedores (FENECH, 2007; OECD 487, 2016).

A perda e não-disjunção cromossômica desempenham papéis chave no envelhecimento celular. Além disso, a determinação da frequência de MNs é considerada como um importante biomarcador carcinogênico, uma vez que células micronucleadas aparecem com frequência em exames de pacientes com câncer (BONASSI *et al.*, 2003; 2007).

Diante dos parâmetros mencionados acima, à boa confiabilidade e facilidade de reprodução, o ensaio do MN tornou-se uma técnica citogenética padrão para testes de toxicologia genética em células humanas e de mamíferos em geral (FENECH, 2007; THIERENS & VRAL, 2009; CHEQUER *et al.*, 2009).

1.4.2. Teste de Ames

O teste de Ames foi desenvolvido pelo Dr. Bruce Ames e colaboradores na década de 70 e revisado por Maron e Ames (1983). É um teste *in vitro* utilizado para avaliar possíveis efeitos mutagênicos causados por substâncias puras, misturas complexas e amostras ambientais (TAGLIARI *et al.*, 1999).

Este ensaio que pode ser realizado utilizando *Salmonella typhimurium* e/ ou *Escherichia coli* baseia-se no conhecimento de que uma substância que é mutagênica na bactéria pode subsequentemente ser carcinogênica em animais de laboratório e, portanto, apresenta um risco de câncer para humanos. A facilidade, rapidez e o baixo custo do teste fazem dele uma importante ferramenta para o rastreamento de substâncias com possível potencial de carcinogenicidade (MARON e AMES, 1983).

Várias linhagens podem ser usadas no teste. Cada uma é geneticamente diferente; assim, o uso de múltiplas cepas aumenta a possibilidade de detectar um mutágeno. As linhagens de *Salmonella* mais usadas são TA97a, TA98, TA100, TA102, TA104, TA1535, TA1537 e TA1538. Elas carregam um gene mutante que as impede de sintetizar o aminoácido essencial histidina em um meio de cultura bacteriano padrão. Já a linhagem de *E. coli*, WP2 uvrA pKM101 rotineiramente utilizada, é portadora de um gene mutante que impede a síntese do aminoácido essencial triptofano. Assim, estas bactérias só podem sobreviver e crescer em meio contendo excesso de histidina (ou triptofano no caso da *E. coli*). No entanto, na presença de um mutágeno, os genes mutados podem sofrer uma nova mutação, permitindo que as bactérias cresçam em meios contendo apenas traços de histidina ou triptofano adicionais, levando a uma recuperação da atividade ou função normal (MORTELMANS e ZEIGER, 2000; MARON e AMES, 1983).

Outro ponto que deve ser considerado é que em seres humanos e outros mamíferos, o sistema metabólico baseado no citocromo P450, presente principalmente no fígado, é capaz de metabolizar um grande número de compostos químicos eletrófilos que se tornam reativos ao DNA, ou seja, muitos produtos químicos não são mutagênicos (ou carcinogênicos) em suas formas nativas, mas podem ser convertidos em substâncias mutagênicas pelo metabolismo no fígado. Como as bactérias não têm a capacidade

metabólica, um sistema de ativação exógeno de mamífero deve ser adicionado ao teste. Os protocolos do teste de Ames recomendam enzimas hepáticas de rato ou hamster, o que é chamado de fração microssomal S9. Este sistema de ativação metabólica consiste na fração sobrenadante de homogeneizado de fígado de rato incorporado no sistema-teste na presença de NADP (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) e co-factores para oxidação (mistura S-9) (MORTELMANS e ZEIGER, 2000; MARON e AMES, 1983).

Frente a tudo isso, ao longo dos anos, o teste de Ames tem sido reconhecido pela comunidade científica, governo, agências e corporações. É usado em todo o mundo para o *screening* inicial, a fim de determinar o potencial mutagênico de novos produtos químicos e drogas, devido seu alto valor preditivo para a carcinogenicidade. Além disso, os dados dos testes são submetidos a agências reguladoras em apoio ao registro ou aceitação de muitos produtos químicos, incluindo drogas e biocidas (CETESB, 1993; MORTELMANS e ZEIGER, 2000; TEJS, 2008; BARBEZAN *et al.*, 2017).

Tabela 1. Características genótípicas e fenotípicas das cepas padrões sugeridas para o Teste de Ames utilizadas no estudo

Cepa	Mutação <i>His</i>	Plasmídeos	Outras mutações	Tipo de mutação detectável
TA98	<i>hisD3052</i>	pKM101	<i>rfaΔ(uvrBchlbio)</i>	Frameshift Deleção G:C
TA100	<i>hisG46</i>	pKM101	<i>rfaΔ(uvrBchlbio)</i>	Substituição G:C para A:T
TA97a	<i>hisD6610</i> <i>hisO1242</i>	pKM101	<i>rfaΔ(uvrBchlbio)</i>	Frameshift Adição G:C
TA102	<i>pAQ1 (hisG428)</i>	pKM101	<i>Rfa</i>	Substituição A:T para G:C

rfaΔ: Esta mutação leva à perda parcial da camada de lipopolissacarídeos da parede bacteriana (LPS), tornando a célula mais permeável a diferentes moléculas.

uvrB: A deleção do gene *uvrB* elimina o mecanismo de reparo por excisão livre de erro (*error free*). A deleção se estende até o gene responsável pela síntese da biotina, tornando as linhagens dependentes de biotina.

pKM101: Este plasmídeo R contém um gene que causa aumento no sistema de reparo passível de erro (*error prone*). O plasmídeo tem a resistência a ampicilina como marcador.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Elucidar o perfil citotóxico e mutagênico de filmes poliméricos de *Allium cepa* L. para o uso como embalagens comestíveis.

2.2. Objetivos Específicos

- a) Determinar a atividade citotóxica dos filmes de *Allium cepa* L. em células HepG2 (ATCC HB-8065TM), carcinoma hepatocelular humano e GM-07492 fibroblastos normais humano;
- b) Avaliar a atividade mutagênica, em nível gênico, dos filmes de *Allium cepa* por meio de ensaios de mutação gênica reversa com *Salmonella typhimurium*, utilizando as cepas TA98, TA97a, TA100 e TA102, na ausência e presença de metabolização;
- c) Avaliar a atividade mutagênica, em nível cromossômico, dos filmes de *Allium cepa* L., por meio do Ensaio do micronúcleo com bloqueio da citocinese em células HepG2.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das amostras

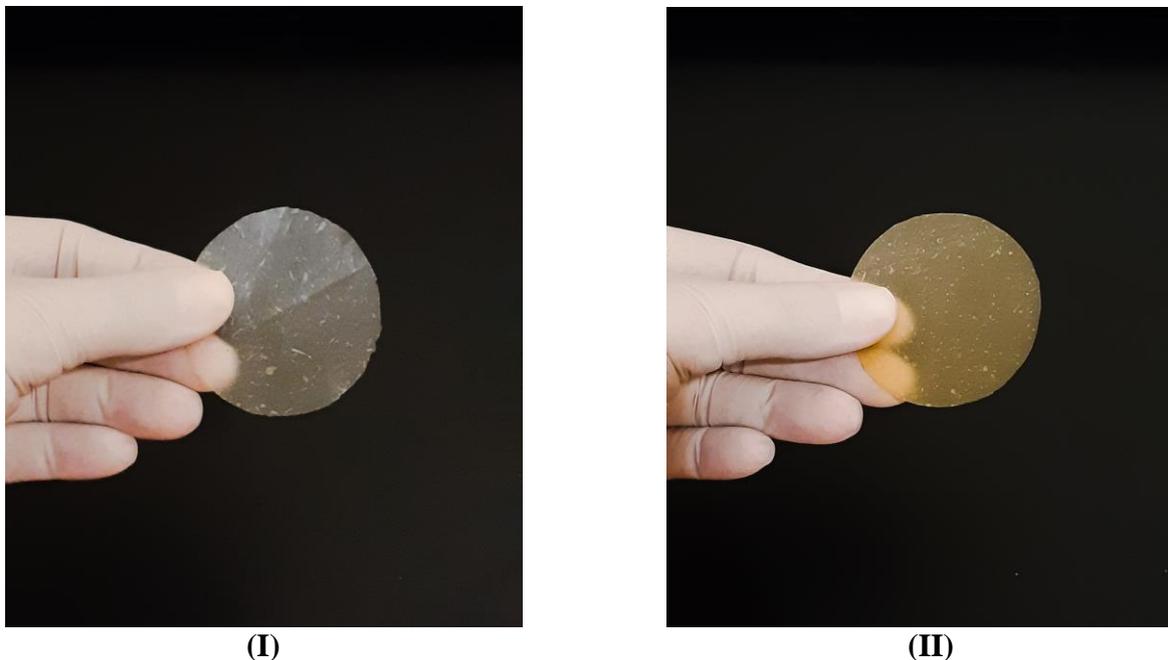
Os filmes *Allium cepa* L. com a finalidade de serem utilizados para embalagens comestíveis foram produzidos e fornecidos pelo Dr. Diógenes dos Santos Dias da empresa BioSmart Nanotechnology.

Todos os filmes foram obtidos pelo processo *casting*. Os bulbos de cebolas (*A. cepa* L.) foram adquiridos em mercados de Araraquara e encaminhados para o processamento. Os bulbos foram lavados para retiradas de impurezas provenientes do solo e da colheita e transporte. Foram retiradas as películas externas com aspecto secas ou deterioradas e fatiadas em quatro no sentido longitudinal e posteriormente lavadas. Tanto os bulbos fatiados e lavados como os respectivos resíduos foram processados.

Os bulbos de cebola fatiados e lavados foram posteriormente adicionados em recipiente de vidro com água destilada. O recipiente foi colocado na autoclave e aquecido a 121°C, na pressão de 1,2 kgf/cm², por aproximadamente 10 minutos. Após o resfriamento o líquido foi descartado, e a polpa tratada termicamente foi processada.

Foram obtidas duas amostras: filmes lavados e não lavados. Os filmes não lavados não passaram por processo de filtração, ou seja, secaram diretamente. Já para preparação dos filmes lavados, a polpa foi triturada e lavada exaustivamente com água destilada.

Figura 4. Filmes de Cebola (*Allium cepa* L.). (I) Filme lavado, (II) Filme não lavado.



3.2. Preparação das amostras para os testes

As amostras foram preparadas de acordo com os padrões estabelecidos pelo FDA (2002). Para a avaliação da citotoxicidade, os filmes com 2,5 cm² permaneceram por 24 horas a 37°C 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), sob agitação. Após esse período, os eluatos obtidos foram utilizados a 100% e realizadas diluições seriadas diretamente nas placas de 96 poços. Para a avaliação da mutagenicidade, a preparação das amostras seguiu o mesmo padrão, no entanto, para o teste de Ames, foi utilizado DMSO e no ensaio do Citoma meio DMEM suplementado com SBF, por 72 horas a 37°C, sob agitação. Após a incubação, foram testadas diferentes concentrações dos eluatos obtidos.

3.3. Linhagens celulares

Para realização dos ensaios de citotoxicidade foram utilizadas as linhagens celulares HepG2 (ATCC HB-8065™) de carcinoma hepatocelular humano e GM-07492 de fibroblastos normais de pulmão humano. Já no ensaio do Citoma, apenas a HepG2 por apresentar perfil de metabolização. Essas células, obtidas no Laboratório de Micobacteriologia e no Laboratório de Mutagênese da FCF - UNESP, Araraquara, foram cultivadas em meio DMEM suplementado com 10% de SFB e 2,38 mg/mL Hepes (Sigma - Aldrich) a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO₂. Antibióticos (0,01 mg/mL de estreptomicina e 0,005 mg/mL de penicilina) foram adicionados ao meio, a fim de prevenir o crescimento bacteriano. As culturas foram repicadas semanalmente por tripsinização até um máximo de 10 passagens.

3.4. Tripsinização das culturas celulares

Após remoção do meio de cultura, as células foram lavadas usando tampão PBS “*Phosphate Buffered Saline*” e desprendidas da superfície interna do frasco de cultura utilizando-se 1 mL de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco). Após o desprendimento das células, 1 mL de meio de cultura completo foi adicionado ao frasco para a inativação da tripsina e homogeneizado. Uma pequena quantidade de células foi, então, colocada em cultivo em novos frascos de cultura de 25 cm² (Corning Incorporated, Acton MA, USA) contendo 5 mL de meio de cultura completo, e submetidas às condições padronizadas de incubação (37°C, em atmosfera com 5% de CO₂ e 95% de saturação de umidade) até a preparação da próxima subcultura.

3.5. Preparo dos estoques celulares

O estoque foi feito a partir de uma subcultura normal, entre o terceiro e quarto repique. As células foram tripsinizadas e mantidas estocadas em viais criogênicos (2 mL) em uma solução de congelamento composta de 50% de meio de cultura (DMEM), 40% de soro bovino fetal e 10% de DMSO. O congelamento procedeu-se gradativamente, ou seja, -20°C por 3 h, -70°C por 3 h e nitrogênio líquido (-195°C) para estocagem definitiva.

3.6. Descongelamento dos estoques celulares

O vial criogênico retirado do nitrogênio líquido permaneceu em temperatura ambiente até que seu conteúdo estivesse completamente descongelado. Este conteúdo foi colocado em um tubo de centrifuga estéril (Corning Incorporated, Acton MA, USA - 15 mL) contendo 5 mL de meio de cultura completo e submetido à centrifugação por 3 minutos a 1000 rpm. O sobrenadante foi descartado e, ao *pellet*, foi acrescentado 2 mL de meio de cultura completo. A suspensão celular foi transferida em um novo frasco contendo 5 mL de meio de cultura completo, o qual foi incubado nas condições previamente descritas.

3.7. Ensaio de viabilidade celular pelo MTT

Os ensaios de citotoxicidade foram realizados utilizando o ensaio do MTT, através de uma avaliação da proliferação celular e análise de colorimétrica, a fim de medir o metabolismo celular.

As linhagens celulares HepG2 e GM-07492 foram incubadas sob condições padronizadas de cultivo celular em garrafas de cultivo de 75 cm², contendo meio de cultura DMEM, suplementado com 10% SFB.

Para a realização dos experimentos, as células foram recolhidas das garrafas de cultivo utilizando 1 mL de tripsina-EDTA 0,5% (Gibco), centrifugadas a 1500 rpm por 5 minutos e contadas em câmara Neubauer, utilizando o método de exclusão pela solução azul de trypan a 0,004% (Sigma), que cora as células inviáveis, a fim de ajustar a concentração para $1,5 \times 10^5$ células/mL.

Em seguida, foram semeadas em microplacas de 96 poços (TPP) obtendo uma concentração celular de $1,5 \times 10^4$ células/poço, a qual foi incubada, sob condições padronizadas de cultivo, durante 24 h para permitir a aderência celular.

Para os tratamentos, os filmes foram preparados como descrito no Item 3.2 e avaliados em concentrações que variaram de 3,12% a 100%. Também foram incluídos os controles negativo (sem tratamento) e positivo (MMS – metilmetanosulfonato – 300 μ M). Todos os tratamentos foram realizados em triplicata e em três experimentos independentes.

Após 24 h de tratamento, as células foram novamente lavadas com solução PBS e 50 μ L de uma solução de MTT (0,5 mg/mL) foram adicionados em cada poço, seguindo por uma incubação de 4 h. Após este tempo, os cristais de MTT-formazan formados foram solubilizados com 100 μ L de 2-propanol (SIGMA-Aldrich) e a absorbância foi medida em 570 nm (Polaris®).

O controle negativo foi designado como 100% e os resultados foram expressos como uma percentagem do controle negativo.

3.8. Mutagenicidade

3.8.1. Teste do micronúcleo com bloqueio de citocinese (citoma)

O ensaio do citoma em células HepG2 foi realizado de acordo com o protocolo estabelecido por Fenech (2007), com algumas modificações. Os ensaios foram realizados entre o quinto e o décimo subcultivo, devido a maior estabilidade celular.

As células foram cultivadas como descrito no ensaio de viabilidade celular.

Para a realização do teste do MN, após atingirem 90-95% de confluência, as células foram recolhidas da garrafa de cultivo com 1 mL de Tripsina-EDTA e contadas em câmara de Neubauer, com o objetivo de se estimar o volume apropriado de células necessário para o preparo da suspensão celular.

Uma quantidade de $5,0 \times 10^5$ células foram inicialmente semeadas em cada frasco de cultura de 25 cm² (Corning) em 5mL de meio de cultura completo, e então incubadas a 37°C, 5% CO₂.

Após 24 h de incubação para adesão celular, as células foram lavadas com solução PBS e então submetidas ao tratamento com três diferentes concentrações dos eluatos de filmes lavados e não lavados (50, 25 e 12,5%).

Como agente indutor de danos foi utilizado a aflatoxina B₁ (AFB₁, 5 µM, Sigma-Aldrich) para avaliar a capacidade metabólica das células HepG2, além do controle negativo (sem tratamento) que também foram incluídos na análise.

Após 24 h de tratamento, foi adicionado a cada garrafa, 50 µL de citocalasina B (3,0 µg/mL) para interromper a citocinese, incubando, então, por mais 28 h.

Para colheita, as células foram lavadas com 5 mL de PBS, tripsinizadas com 1 mL de tripsina-EDTA 0,25% (Gibco) e centrifugadas a 900 rpm por 5 minutos. O sedimento celular foi hipotonizado com 3 mL de solução de cloreto de potássio (Sigma) (1%) a 37°C, e então levemente homogeneizado. Essa suspensão de células foi centrifugada sob as mesmas condições. Posteriormente, o sedimento foi resuspenso em metanol: ácido acético (3:1) para fixação, homogeneizado e centrifugado novamente. As células fixadas foram gotejadas sobre lâminas previamente lavadas.

Após a secagem das lâminas em temperatura ambiente, o material foi corado com *Acridine Orange* (1 mg/mL) no momento da análise por microscopia de fluorescência.

O critério usado para análise de MNs, PNPs e BRs foi estabelecido por Fenech (2007). Um total de 6000 células binucleadas viáveis foi avaliado para cada tratamento e controles, sendo 2000 células/cultura/repetição. Além disso, foram contadas 1500 células viáveis, com citoplasma bem preservado, entre mononucleadas, binucleadas, trinucleadas e multinucleadas (quatro ou mais núcleos) para o cálculo do Índice de Divisão Nuclear

(IDN), ou seja, 500 células/cultura/repetição (FENECH, 2007). O IDN foi calculado de acordo com Eastmond e Tucker (1989), utilizando a fórmula:

$$\text{IDN} = \frac{[M1 + 2(M2) + 3(M3) + 4(M4)]}{N}$$

onde M1 - M4 é o número de células com 1, 2, 3 e 4 núcleos, respectivamente, e N é o número total de células viáveis. A frequência de MNs, PNs, BRs e os IDNs foram calculados a partir de três experimentos independentes para garantir a reprodutibilidade.

3.8.2 *Teste de Ames*

As linhagens TA100, TA98, TA102 e TA97a de *S. typhimurium* foram gentilmente cedidas pela Prof^a Dr^a Eliana Aparecida Varanda da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara (UNESP). Essas linhagens foram inicialmente adquiridas através do Dr. Bruce Ames da Universidade de Berkeley, Califórnia, EUA.

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 12-16 horas, em *shaker* incubador (37°C – 160 rpm), de modo a obter uma densidade de 1-2 x10⁹ bactérias/ mL.

Como controles positivos foram utilizados agentes mutagênicos padrões para confirmar as propriedades de reversão e especificidade de cada cepa. 4-nitrofenilenodiamino (10 µg / placa) para TA98 e TA97a, azida sódica (1,25 µg / placa) para TA100 e mitomicina C (0,5 µg / placa) para TA102 em experimentos sem a mistura S9 e 2-antramine (1,25 µg / placa) em todas as linhagens nos experimentos com ativação metabólica. O controle negativo foi o DMSO (100 µL/ placa), veículo utilizado na preparação dos eluatos de filmes de cebola.

Para o ensaio de pré-incubação, diferentes concentrações dos eluatos (12,5, 25, 50, 75 e 100 µL) foram misturadas a 0,5 mL de tampão fosfato 0,2M pH 7,4, 0,1 mL de

cultura de bactérias e incubadas por 20 minutos a 37°C. Nos ensaios com ativação metabólica, foram adicionados, em substituição ao tampão fosfato, 0,5 mL da fração microsomal S9 (S9 mix) preparada a partir de homogeneizados de fígado de ratos Sprague Dawley, previamente tratados com Aroclor 1254, adquiridos sob a forma liofilizada da Moltax Molecular Toxicology Inc., Boone, USA. Essa mistura S9 revela se a substância ou amostra é mutagênica em sua forma original ou se necessita ser metabolizada ou ativada para se tornar mutagênica. O sistema de ativação metabólica consiste 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 e AMES, 1983).

Decorrido o tempo de incubação, 2 mL de “*top agar*” (ágar de superfície), suplementado com traços de L-histidina (50 µM) e D-biotina (50 µM), foram adicionados a mistura presente nos tubos. O conteúdo de cada tubo, assim composto, foi levemente homogeneizado em vórtex e vertido sobre a superfície de uma placa contendo ágar mínimo glicosado. Após solidificação do “*top ágar*”, as placas foram incubadas por 48 h, a 37°C. Ao término desse período, foi realizada a contagem do número de colônias revertentes por placa. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.9. Análise estatística

Os dados obtidos nos ensaios de viabilidade celular e do citoma foram submetidos ao programa estatístico GraphPad Prism5 (Graph-Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) à análise de variância ANOVA (assumindo $p < 0,05$), seguida pelo pós-teste de Tukey.

No teste de Ames, 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, RTI, 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. Além disso, o índice de mutagenicidade (IM) foi calculado para cada concentração testada, sendo

este média do número de revertentes/ placa com o composto-teste (revertentes induzidas) dividida pela média do número de revertentes/ placa com o controle (solvente) negativo. A amostra é considerada mutagênica quando há uma relação dose resposta entre as concentrações e o número de revertentes induzidos e/ ou quando o IM for maior ou igual a dois em pelo menos uma das doses testadas (MORTELMANS e ZEIGER, 2000).

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

4. RESULTADOS

4.1. Citotoxicidade

Os resultados do teste do MTT para avaliação da viabilidade celular estão apresentados nas Figuras 5 e 6, expressos em porcentagem de células viáveis, para as culturas de células HepG2 e GM-07492, respectivamente, tratadas com as diferentes concentrações dos eluatos dos filmes de cebola lavados e não lavados.

Tanto o filme lavado quanto o não lavado apresentaram uma redução estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) na viabilidade celular nos tratamentos com as maiores concentrações testadas (100, 50 e 25% dos eluatos) comparado ao controle negativo nas culturas de HepG2. Essa redução foi de aproximadamente 30% para o filme lavado e 50% para o não lavado na maior concentração avaliada.

Com relação às culturas de GM-07492, as diferenças estatisticamente significativas na viabilidade celular nos tratamentos com os filmes não lavados foram mais acentuadas. A redução foi estatisticamente significativa até a concentração de 12,5%, com morte de aproximadamente 60 % na maior concentração avaliada. Já os filmes lavados induziram uma alteração estatisticamente significativa na viabilidade celular somente nos tratamentos com 100 e 50% do eluato quando comparado ao controle negativo.

Os resultados obtidos também mostraram uma redução estatisticamente significativa na viabilidade celular das culturas tratadas com MMS (controle positivo), garantindo a sensibilidade do sistema-teste. A viabilidade celular de GM-07492 frente ao MMS foi aproximadamente 46% e de HepG2 43%.

Figura 5. Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células HepG2 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações dos extratos dos filmes lavados e não lavados de *Allium cepa* L. CN: controle negativo (DMEM com 10% de SBF – 100% de viabilidade celular) CP: controle positivo (metilmetanosulfonato, 300 μ M – 43% de viabilidade celular). Resultados obtidos de três ensaios independentes. *estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).

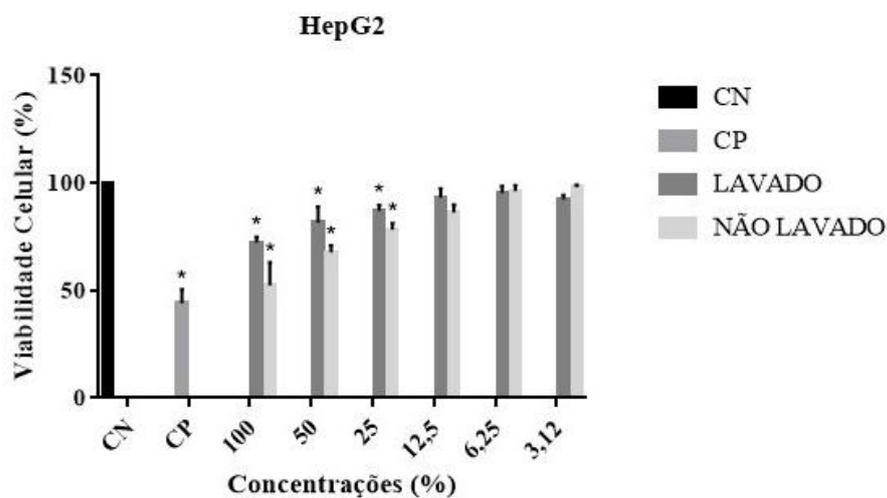
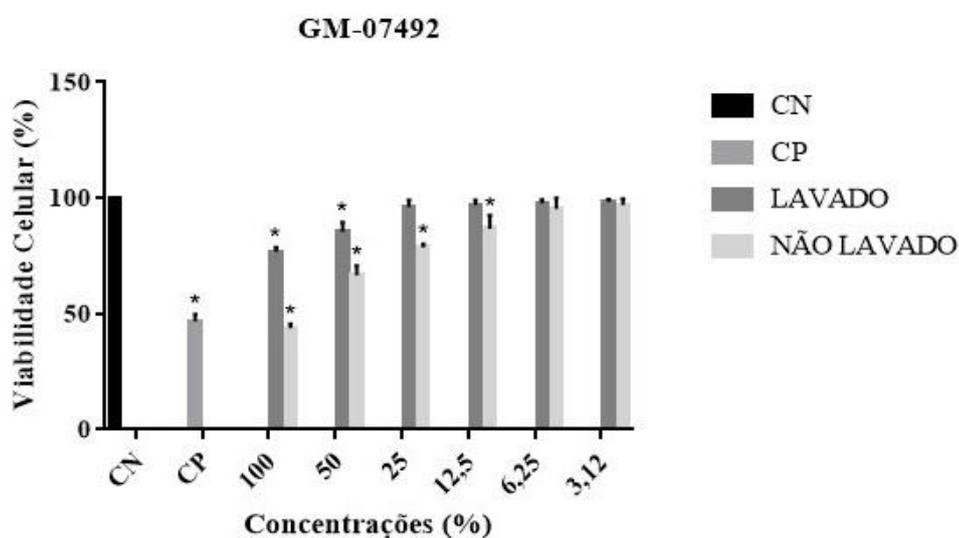


Figura 6. Viabilidade celular determinada pelo ensaio do MTT em células GM-07492 tratadas por 24 horas com diferentes concentrações dos extratos dos filmes lavados e não lavados de *Allium cepa* L. CN: controle negativo (DMEM com 10% de SBF – 100% de viabilidade celular) CP: controle positivo (metilmetanosulfonato, 300 μ M – 46% de viabilidade celular). Resultados obtidos de três ensaios independentes. *estatisticamente diferente do CN ($p < 0,05$, ANOVA, seguido pelo teste de Tukey).



4.2. Mutagenicidade

A tabela 2 apresenta as médias e os desvios padrão da frequência de MNs, PNPs, BRs (**Figura 7**) e IDN induzidos pelos tratamentos com os eluatos de filmes de cebola lavado e não lavado em cultura de células HepG2.

Os resultados obtidos mostraram que as concentrações avaliadas dos filmes não induziram um aumento, estatisticamente significativo, no número total dos parâmetros avaliados em relação ao controle negativo, indicando assim que estes eluatos não foram capazes de induzir mutações cromossômicas nas condições utilizadas neste estudo.

Além disso, podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significativas nos valores de IDN, demonstrando também a ausência de citotoxicidade.

O IDN fornece uma medida do estado proliferativo das células viáveis. Sendo assim, o menor valor possível de IDN é 1,0, o que ocorre quando todas as células não se dividiram ou não tiveram a citocinese bloqueada e, portanto, estão todas mononucleadas. Se todas as células completaram um ciclo de divisão e, portanto, estão todas binucleadas, o IDN será 2,0. Neste estudo, os valores dos tratamentos com os eluatos variaram de 1,7 a 1,9.

Tabela 2. Média e desvio padrão do número de Micronúcleos (MNs), Pontes Nucleoplasmáticas (PNPs), Brotos Nucleares (BRs) e Índice de Divisão Nuclear (IDN) de culturas de células HepG2 tratadas com diferentes concentrações dos extratos dos filmes de cebola lavado e não-lavado

Tratamentos	MN ^a	PNP ^a	BR ^a	IDN ^b
DMEM	3 ± 1	1 ± 1	3 ± 1	1,92 ± 0,16
AFB₁	21 ^c ± 1	3 ± 1	12 ^c ± 1	1,38 ^c ± 0,04
12,5%				
Não lavado	4 ± 2	0 ± 0	5 ± 1	1,94 ± 0,14
Lavado	2 ± 1	0 ± 0	1 ± 0	1,89 ± 0,18
25%				
Não lavado	3 ± 1	0 ± 0	4 ± 1	1,94 ± 0,12
Lavado	2 ± 0	0 ± 0	3 ± 0	1,93 ± 0,11
50%				
Não lavado	1 ± 0	0 ± 0	2 ± 0	1,77 ± 0,09
Lavado	2 ± 1	0 ± 0	1 ± 0	1,94 ± 0,21

Valores mostrados como média ± desvio padrão.

MN: micronúcleo; PNP: ponte nucleoplasmática; BR: brotos nucleares, IDN: índice de divisão nuclear.

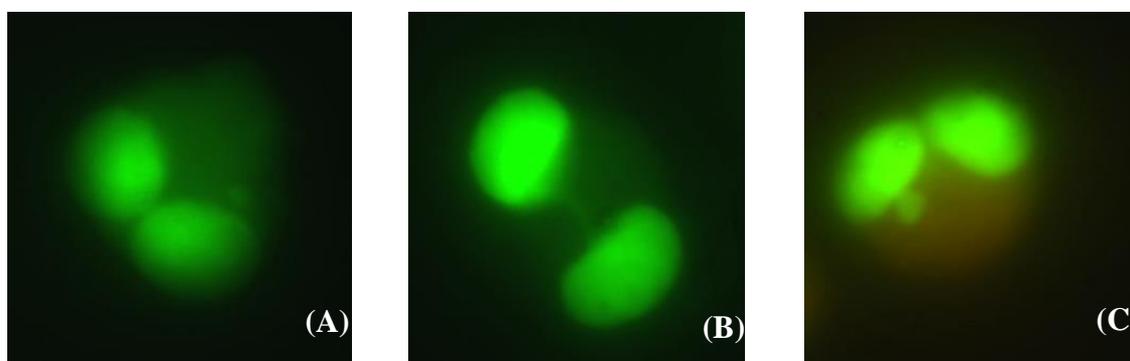
Controle negativo: DMEM; Controle Positivo: AFB₁ - aflatoxina B₁ (5 µM)

^a Um total de 2000 células binucleadas foram analisadas por grupo de tratamento.

^b Um total de 1000 células foram analisadas por grupo de tratamento.

^c Estatisticamente diferente do grupo DMEM ($P < 0,05$).

Figura 7. Alterações cromossômicas: Micronúcleos (A), pontes nucleoplasmáticas (B) e brotos nucleares (C) amplitude 1000x, células HepG2 coradas com *Acridine Orange*



Fonte: Arquivo pessoal

Já o teste de Ames foi realizado na presença e ausência da fração S9, usando o método de pré-incubação. As Tabelas 2 e 3 apresentam a média do número de revertentes/placa (M), o desvio padrão (DP) e o índice de mutagenicidade (IM) após os tratamentos com as diferentes concentrações (12,5%; 25% e 50%) dos extratos dos filmes não lavados e lavados, respectivamente.

Após a exposição das linhagens bacterianas aos eluatos de filmes de cebola, os resultados obtidos mostraram que o filme não lavado induziu um aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes em comparação ao controle negativo nas linhagens TA98, TA100 e TA102. No entanto, os resultados mostraram somente indícios de mutagenicidade, pois o índice de mutagenicidade máximo foi de 1,9 (**Tabela 3**).

Já com o filme lavado não foi observado qualquer aumento estatisticamente significativo do número de revertentes, em nenhuma das concentrações e linhagens utilizadas, na ausência e presença de ativação metabólica (**Tabela 4**). Esses resultados levam a conclusão de que este filme não é capaz de provocar mutações gênicas, evidenciado pelo Teste de Ames.

Tabela 3. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com várias concentrações do extrato do filme de cebola não-lavado, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica

Tratamentos	Número de revertentes (M ± SD)/ placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
μL/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CN ^a	23 ± 6	31 ± 8	102 ± 12	107 ± 12	321 ± 60	353 ± 38	248 ± 10	189 ± 14
12,5	20 ± 4 (0,87)	37 ± 6 (1,20)	105 ± 4 (1,03)	112 ± 8 (1,05)	497 ± 43* (1,55)	368 ± 19 (1,04)	213 ± 12 (0,86)	249 ± 11 (1,32)
25	24 ± 6 (1,06)	35 ± 9 (1,16)	101 ± 20 (0,99)	117 ± 10 (1,10)	511 ± 23* (1,59)	383 ± 17 (1,08)	224 ± 14 (0,90)	254 ± 11 (1,34)
50	31 ± 8 (1,33)	37 ± 0 (1,21)	111 ± 19 (1,09)	130 ± 25 (1,22)	590 ± 44* (1,83)	442 ± 30 (1,25)	217 ± 1 (0,88)	279 ± 2 (1,47)
75	39 ± 1* (1,68)	37 ± 7 (1,21)	120 ± 9 (1,17)	175 ± 22* (1,65)	573 ± 34* (1,78)	420 ± 9 (1,19)	213 ± 1 (0,86)	282 ± 14 (1,49)
100	44 ± 8* (1,89)	38 ± 5 (1,26)	124 ± 2 (1,21)	204 ± 17* (1,92)	565 ± 28* (1,76)	430 ± 32 (1,22)	224 ± 53 (0,90)	282 ± 9 (1,49)
C +	504 ± 48 ^b	2899 ± 319 ^e	2242 ± 280 ^c	3575 ± 97 ^e	2858 ± 485 ^d	1511 ± 188 ^f	1568 ± 48 ^b	2690 ± 490 ^e

M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^a CN = Controle Negativo: dimetilsulfóxido (DMSO – 100 μL/placa); C + = Controle Positivo – ^b4-nitro-o-fenilenodiamina (10,0 μg/placa – TA98, TA97a); ^cazida sódica (1,25 μg/placa – TA100); ^dmitomicina (0,5 μg/placa – TA102), na ausência de S9 e ^e2-antramina (1,25 μg/placa – TA97a, TA98, TA100); ^f2-aminofluorene (10,0 μg/placa – TA102), na presença de S9. Valores entre parênteses (IM) ≥ 2 indicam mutagenicidade.

Tabela 4. Atividade mutagênica expressa através da média e desvio padrão do número de revertentes/placa e índice de mutagenicidade nas linhagens TA98, TA100, TA97a e TA102 de *S. typhimurium* após o tratamento com várias concentrações do filme de cebola lavado, em experimentos sem (-S9) e com (+S9) ativação metabólica.

Tratamentos	Número de revertentes (M ± SD)/ placa e IM							
	TA 98		TA 100		TA 102		TA 97a	
µL/placa	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9	- S9	+ S9
CN ^a	23 ± 6	31 ± 8	102 ± 12	107 ± 12	321 ± 60	353 ± 38	248 ± 10	189 ± 14
12,5	24 ± 4 (1,04)	29 ± 4 (0,94)	95 ± 4 (0,93)	108 ± 5 (1,02)	396 ± 62 (1,23)	334 ± 19 (0,94)	218 ± 51 (0,88)	195 ± 17 (1,03)
25	24 ± 8 (1,04)	29 ± 1 (0,96)	103 ± 49 (1,01)	114 ± 12 (1,07)	422 ± 54 (1,31)	420 ± 103 (1,19)	189 ± 9 (0,76)	211 ± 7 (1,11)
50	26 ± 4 (1,12)	31 ± 4 (1,02)	108 ± 24 (1,06)	127 ± 7 (1,19)	445 ± 30 (1,39)	440 ± 12 (1,25)	204 ± 61 (0,82)	226 ± 15 (1,19)
75	27 ± 2 (1,16)	37 ± 4 (1,20)	111 ± 4 (1,08)	141 ± 33 (1,33)	453 ± 47 (1,41)	460 ± 32 (1,30)	208 ± 59 (0,84)	224 ± 21 (1,18)
100	30 ± 4 (1,30)	36 ± 2 (1,19)	119 ± 12 (1,16)	135 ± 19 (1,26)	478 ± 22 (1,49)	462 ± 77 (1,31)	172 ± 5 (0,69)	224 ± 34 (1,18)
C +	504 ± 48 ^b	2899 ± 319 ^e	2242 ± 280 ^e	3575 ± 97 ^e	2858 ± 485 ^d	1511 ± 188 ^f	1568 ± 48 ^b	2690 ± 490 ^e

M ± DP = média e desvio padrão; IM = índice de mutagenicidade; ^a CN = Controle Negativo: dimetilsulfóxido (DMSO – 100 µL/placa); C + = Controle Positivo – ^b4-nitro-o-fenilenodiamina (10,0 µg/placa – TA98, TA97a); ^cazida sódica (1,25 µg/placa – TA100); ^dmitomicina (0,5 µg/placa – TA102), na ausência de S9 e ^e2-antramina (1,25 µg/placa – TA97a, TA98, TA100); ^f2-aminofluorene (10,0 µg/placa – TA102), na presença de S9. Valores entre parênteses (IM) ≥ 2 indicam mutagenicidade.

5. DISCUSSÃO

Os aditivos alimentares sintéticos são geralmente reconhecidos como seguros e têm um efeito benéfico na conservação de alimentos. Entretanto, os consumidores tornaram-se mais conscientes sobre os potenciais problemas de saúde associados a essas substâncias e exigem compostos alternativos ou extratos de fontes naturais. Assim, o consumismo “verde” levou à renovação da visão científica em relação aos produtos naturais (MELLADO-GARCÍA *et al.*, 2015).

No entanto, apesar dos efeitos benéficos atribuídos às plantas do gênero *Allium*, existe uma crescente conscientização sobre os riscos relacionados também aos produtos naturais sem uma investigação detalhada que garanta a segurança do seu uso. Além disso, não foram encontrados estudos sobre a citotoxicidade e mutagenicidade / genotoxicidade de filmes poliméricos de cebola que elucidam os riscos potenciais associados ao seu uso na indústria de alimentos como embalagens comestíveis. Nesse sentido, no presente estudo, as atividades citotóxica e mutagênica foram avaliadas.

Os resultados obtidos nos ensaios de citotoxicidade revelaram que os filmes lavados e não lavados reduziram estatisticamente a viabilidade celular nas maiores concentrações testadas em relação ao controle negativo quando avaliados pelo ensaio MTT. De acordo com a norma I.S. EN ISO 10993-5:2009, a viabilidade celular deve ser $\geq 70\%$ em comparação com o grupo controle. Os resultados mostraram que o filme lavado apresenta-se em conformidade com a norma, frente às duas linhagens celulares (HepG2 e GM-07492), desde a maior concentração utilizada (100% de eluato), enquanto que o filme não lavado, a viabilidade celular acima de 70% só foi observada a partir da concentração de 25% de eluato no ensaio. Isto demonstra a possibilidade de aplicação, principalmente dos filmes lavados, na indústria de alimentos, de embalagens e de bioamateriais.

Com relação ao sistema-teste utilizado neste trabalho para a avaliação da citotoxicidade, as células vivas utilizam o MTT (coloração amarela) como substrato que é reduzido para produzir o sal formazan (coloração violeta). A quantidade de cristais formados tem uma correlação positiva com o número de células e sua atividade e a medição do valor colorimétrico de absorbância (densidade óptica) reflete o número de

células sobreviventes e atividade metabólica. O ensaio MTT é um dos mais utilizados para a detecção de citotoxicidade ou viabilidade celular após a exposição a substâncias tóxicas, sendo já validado em diferentes linhagens celulares (FOTAKIS e TIMBRELL, 2006).

Nossos resultados estão em concordância com os obtidos por Cho *et al.* (2016), que recentemente também observaram um efeito citotóxico nas altas doses de extrato de cebola (20 µL/ mL) em culturas de linfócitos humanos. Murayyan *et al.* (2017) também investigaram as atividades antiproliferativas, citotóxicas, indutoras de apoptose e anti-migratórias de cinco variedades de cebola contra células de adenocarcinoma humano (Caco-2). De uma maneira geral, os extratos, com sutis diferenças entre eles, induziram significativamente a apoptose, reduzindo a taxa de proliferação e retardaram a migração dessas células tumorais, nas maiores concentrações testadas. De acordo com os autores, essas diferenças entre as variedades de cebolas se devem principalmente aos fatores agrônômicos e genéticos que influenciam a composição, bem como a qualidade dos fitoquímicos (por exemplo, flavonoides).

Sobre a mutagenicidade, de acordo com as Diretrizes do Comitê Científico em Avaliação da Segurança de Alimentos (EFSA, 2016), recomenda-se uma abordagem gradual que começa com uma bateria básica de dois testes *in vitro*, (1) ensaio de mutação reversa bacteriana (OECDTG 471, 1997) e (2) teste do MN *in vitro* (OECDTG 487, 2016).

O ensaio de mutação reversa bacteriana em *Salmonella typhimurium* (teste de Ames) não só é financeiramente viável, como reconhecido pelo FDA (Food and Drugs Administration) e reproduzível. De acordo com a literatura, tem sido capaz de detectar cerca de 90% dos carcinogênicos humanos conhecidos. Por isso, é o método de primeira escolha para uma avaliação preliminar da mutagenicidade e carcinogenicidade. É considerado o melhor ensaio autônomo para identificação da mutagenicidade, sendo amplamente utilizado para detectar mutações gênicas em diversos segmentos (MAHADEVAN *et al.*, 2011; BARBEZAN *et al.*, 2017). Já o teste do MN usando células de mamíferos é um dos métodos preferidos para avaliar danos cromossômicos, pois detecta eficientemente agentes clastogênicos e aneugênicos (EFSA, 2011). O uso simultâneo destes ensaios permite uma avaliação mais completa do risco genotóxico do composto testado, com a maior possibilidade de detectar carcinógenos relevantes (MELLADO-GARCÍA *et al.*, 2015).

Os resultados negativos obtidos para o filme lavado no teste de Ames, tanto nos ensaios com metabolização como sem a fração S9, correlacionam-se bem com a resposta negativa apresentada no ensaio do Citoma, bem como o filme não lavado que apresentou somente indícios de mutagenicidade nos experimentos sem ativação metabólica e nenhum efeito positivo nos experimentos com ativação metabólica, exceto frente à linhagem TA100 (IM máximo= 1,92). Essa falta de concordância entre os resultados obtidos no teste de Ames, na presença de S9 com a cepa TA100 e no teste do Citoma com as células HepG2, pode ser explicada por diferenças nos modelos experimentais empregados, ou seja, as células procariontes e eucariontes possuem diferentes captações, metabolismo, estrutura cromossômica e processos de reparo de DNA, podendo dessa maneira produzir metabólitos diferentes (MELLADO-GARCÍA *et al.*, 2015). Além disso, os testes de Ames e MN medem diferentes parâmetros moleculares, de modo que é possível que um produto químico seja capaz de induzir quebra cromossômica, por exemplo, (medida pelo teste do MN), mas não alterações de pares de bases avaliadas pelo teste de Ames (KIRKLANDK *et al.*, 2014).

As células HepG2 conservam as atividades das enzimas de fase I, tais como as do citocromo P450 CYP1A1, CYP1A2, CYP2B e CYP2E1, como também as enzimas de fase II, incluindo glutationa-S-transferases, sulfotransferases, N-acetiltransferases e glucuranosiltransferases, sendo que tais enzimas estão envolvidas no metabolismo de carcinógenos, as quais apresentam importante função na ativação e detoxificação de carcinógenos reativos de DNA (DEHN *et al.*, 2004; HOSHINA *et al.*, 2013).

Roldán-Marín *et al.* (2009) investigaram os potenciais efeitos de saúde e segurança de um subproduto da cebola, contendo um extrato com fruto-oligossacarídeos e polifenóis e uma fração de resíduo constituído principalmente de materiais da parede celular, a fim de caracterizar um ingrediente alimentar potencialmente bioativo. Em conclusão, os subprodutos da cebola não demonstraram genotoxicidade *in vivo*, podem apoiar a defesa antioxidante *in vivo* e alteraram a funcionalidade da microbiota intestinal de ratos.

No que diz respeito a composição química, a cebola representa uma das fontes mais comuns de flavonóides na dieta humana (MURAYYAN *et al.*, 2017). De acordo com Rodriguez *et al.* (2008), dois componentes principais, o glicosídeo de quercetina e o diglicosídeo de quercetina são responsáveis por 80% do total de flavonóides nas cebolas,

sendo a quercetina-3,4'-*O*-glicosídeo e quercetina monoglicosídeo (quercetina 4'-*O*-glicosídeo) os principais flavonóis.

A fórmula estrutural da quercetina contém todos os elementos estruturais necessários para a atividade antioxidante e pró-oxidante (RIETJENS *et al.*, 2005), o que podem fornecer um conhecimento sobre a sua aparente mutagenicidade *in vitro* (van der WOUDE *et al.* 2005; HARWOOD *et al.*, 2007) ou antimutagenicidade (RESENDE *et al.*, 2014). O mecanismo de mutagenicidade sugerido envolve a ativação metabólica, levando à formação de metabólitos catecol e subsequente oxidação para *o*-quinona e, em alguns casos para metabólitos *p*-quinona metide (van der WOUDE *et al.*, 2005; RESENDE *et al.*, 2012). Dessa maneira, os indícios de mutagenicidade observados neste trabalho com relação aos filmes não lavados no teste de Ames não podem ser correlacionados totalmente devido a presença desse flavonol no eluato, mesmo porque a quercetina induz substituição de pares de bases (TA100, TA102) e, a uma taxa muito mais elevada, mutações do tipo *frameshift* (TA98), principalmente após ativação metabólica (RESENDE *et al.*, 2012), o que não foi observado neste estudo com os filmes de cebola.

Recentemente, Farag *et al.* (2017) investigaram a composição química da cebola e do alho por meio da micro-extração por fase sólida (SPME, do inglês *solid phase microextraction*) e cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (SPME/GC/MS) e pela cromatografia líquida de ultra eficiência (UPLC, do inglês *ultra-performance liquid chromatography*) também acoplada a espectrometria de massas, a fim de avaliar o impacto da secagem na composição de seus metabólitos. Os resultados mostraram que o teor de flavonóides da cebola foi significativamente alterado após a secagem, permanecendo mais abundante na liofilização em comparação com amostras secas ao ar e microondas. Este é um importante parâmetro que deve ser avaliado, uma vez que os filmes utilizados no presente estudo foram obtidos pelo método *casting* (secagem). No entanto, a caracterização química dos filmes lavados e não lavados ainda está sendo realizada.

Os compostos organosulfurados também estão se tornando alvo de muitas investigações devido aos seus potenciais efeitos quimiopreventivos e antioxidantes, mas suas propriedades tóxicas são motivo de preocupação e limitam seu uso. Estão presentes principalmente nos óleos essenciais de alho e cebola e estudos revelam efeitos tanto

genotóxicos como antígenotóxicos (BIANCHINI e VAINIO, 2001; LANZOTTI, 2006; STAN *et al.*, 2008). Devido esses resultados contraditórios, a avaliação do perfil toxicológico é necessária antes de seu uso na indústria de alimentos, particularmente para serem incorporados em materiais de contato com alimentos (LLANA-RUIZ-CABELLO *et al.*, 2015; MELLADO-GARCÍA *et al.* 2015, 2017).

Llana-Ruiz-Cabello *et al.* (2015a) relataram a falta de mutagenicidade de dois outros compostos organosulfurados, dipropil sulfeto e dipropil-di-sulfureto e sua mistura 1:1, na ausência ou presença de ativação metabólica S9. De acordo com os autores, esses compostos voláteis encontrados na cebola podem ser destinados a embalagens ativas com o objetivo de manter e estender a qualidade e o prazo de validade dos produtos. No entanto, Mellado-García *et al.* (2015) avaliaram a mutagenicidade/genotoxicidade do propiltiosulfinato (PTSO), um dos principais componentes de óleos essenciais de cebola (*Allium cepa* L.) e alho (*Allium sativum* L.). Os resultados revelaram ausência de mutagenicidade no teste de Ames, além de não ser capaz de induzir quebras ou dano oxidativo ao DNA avaliados no ensaio do cometa, mas foi mutagênico no teste em Linfoma de rato (timidinaquinase) após 24 horas de tratamento (2,5 a 20 μM) e seus metabólitos (na presença S9) produziram resultados positivos (a partir de 15 μM) no teste do MN em células de mamíferos. Além disso, estudos prévios de citotoxicidade demonstraram que o composto PTSO induz danos em altas concentrações em células Caco-2 e HepG2 (LLANA-RUIZ-CABELLO *et al.*, 2015). O mesmo foi feito com outro composto organosulfurado, o tiosulfinato de propilpropano (PTS), que não foi mutagênico no teste de Ames e no teste em Linfoma de rato, mas induziu um aumento na frequência de MN na maior concentração testada em experimentos sem e com S9 e danos no DNA pelo ensaio do Cometa (MELLADO-GARCÍA *et al.*, 2017).

Outra questão que deve ser considerada com relação a diferença nos resultados obtidos com os filmes lavados e não lavados, tanto na citotoxicidade quanto mutagenicidade pelo teste de Ames, são os fatores agrônômicos que podem influenciar a qualidade dos fitoquímicos entre os cultivos de cebola (TOMAS-BAREBERAN e ESPIN, 2001), impactando negativamente os benefícios que esses nutrientes proporcionam (MURAYYAN *et al.*, 2017).

Frente a tudo isso, os dados do presente estudo têm importantes implicações para a análise dos riscos associados à dieta de filmes de cebola como embalagens comestíveis. Principalmente o filme lavado pode ser incorporado com sucesso na indústria de alimentos, devido sua ausência de mutagenicidade *in vitro* e em conformidade nos ensaios de citotoxicidade. No entanto, ensaios de genotoxicidade *in vivo* devem ser realizados, a fim de garantir seu uso seguro.

6. CONCLUSÃO

O estudo sobre a citotoxicidade e mutagenicidade dos extratos dos filmes lavados e não lavados de cebola (*A. cepa*), nas condições utilizadas, levou às seguintes conclusões:

- Os filmes lavados e não lavados apresentaram potencial citotóxico nas duas linhagens celulares avaliadas. Frente à linhagem HepG2, o padrão citotóxico foi semelhante, com uma redução estatisticamente significativa nas maiores concentrações avaliadas (100, 50 e 25%) de ambos os filmes. Já nas culturas de GM-07492, o filme não lavado apresentou um potencial citotóxico mais evidente nas concentrações de 100, 50, 25 e 12,5% em comparação ao controle negativo. Nos tratamentos com os filmes lavados, a redução da viabilidade celular foi observada somente nas concentrações de 100 e 50%.

- Os filmes lavados e não lavados não induziram mutações cromossômicas avaliadas pelo teste do micronúcleo-citoma na linhagem celular HepG2.

- No teste de Ames, os filmes não lavados induziram um aumento estatisticamente significativo no número de colônias revertentes quando comparado com o controle negativo. No entanto, o IM não foi maior que 2, não evidenciando, dessa maneira, potencial mutagênico. Já os filmes lavados não demonstraram qualquer atividade mutagênica, nas condições utilizadas neste sistema-teste.

7. REFERÊNCIAS

AMERICAN SOCIETY FOR TESTING AND MATERIALS - ASTM. D5511-12, 2005. Standard test for determining anaerobic biodegradation of plastic materials under high-solids anaerobic-digestion conditions.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos Principais Corantes para Alimentos. *Revista de Nutrição*, v. 13, p. 81-88, 2000.

ANVISA –Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Guia para Comprovação da Segurança de Alimentos e Ingredientes**. Gerência de Produtos Especiais e Gerência Geral de Alimentos, Brasília, 2013.

BARBEZAN, A. B.; MARTINS, R.; BUENO, J. B.; VILLAVICENCIO, A. L. C. H. Ames test to detect mutagenicity of 2-Alkylcyclobutanones: a review. *Journal of Food Science*. v. 82, n. 7, 2017

BARROS, S.; ROPKE, C. D.; SAWADA, T. C. H.; SILVA, V. V.; PEREIRA, S. M. M.; BARROS, S. B. M. Assessment of acute and subchronic oral toxicity of ethanolic extract of *Pothomorpheumbellata*L. Miq (Pariparoba). *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 41, n. 1, 2005.

BERETTA H.V.; BANNOUD, F.; INSANI M. *et al.* Relationships Between Bioactive Compound Content and the Antiplatelet and Antioxidant Activities of Six *Allium* Vegetable Species. *Food Technology and Biotechnology*. v.55(2), p.266-275, 2017.

BERNSTEIN, L.; KALDOR, J.; MCCANN, J./ PIKE, M.C. An empirical approach to the statistical analysis of mutagenesis data from the *Salmonella* test. *Mutat. Res.*, v. 97, n. 4, p. 267-281, 1982.

BIANCHINI, F. & VAINIO, H. *Allium* vegetables and organosulfur compounds: do they help prevent cancer?. *Environ Health Perspect*. v. 109, p. 893–902, 2001.

BONASSI, S., NERI, M., LANDO, C., CEPPI, M., LIN, Y.P., CHANG, W.P., HOLLAND, N., KIRSCH-VOLDERS, M., ZEIGER, E., FENECH, M. Effect of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes: results from the Human Micronucleus Project. *Mutation Research*, v. 543, n. 2, p. 155-166, 2003.

BONASSI, S.; ZNAOR, A.; CEPPI, M.; LANDO, C.; CHANG, WP.; HOLLAND, N.; KIRSCHVOLDERS, M.; ZEIGER, E.; BAN, S.; BARALE, R.; BIGATTI, M. P.; BOLOGNESI, C.; CEBULSKA-WASILEWSKA, A.; FABIANOVA, E.; FUCIC, A.; HAGMAR, L.; JOKSIC, G.; MARTELLI, A.; MIGLIORE, L.; MIRKOVA, E.; SCARFI, M.R.; ZIJNO, A.; NORPPA, H.; FENECH, M. An increase micrnucleus frequency in peripheral blood lymphocytes predicts the risk of câncer in humans. *Carcinogenesis Advance Access*, v. 28, n. 3, p. 625-631, 2007.

BRITO, G. F.; AGRAWAL, P.; ARAÚJO, E. M., MÉLO, T. J. A. Biopolímeros, Polímeros Biodegradáveis e Polímeros Verdes. *Revista Eletrônica de Materiais e Processos*, v. 6, n. 2, p. 127-139, 2011.

CETESB – Companhia Ambiental do Estado de São Paulo. Norma técnica L5.620: Mutação gênica reversa em *Salmonella typhimurium* - teste de ames: método de ensaio. São Paulo. 40 p. 1993.

CHEQUER, F. M. D.; ANGELI, J. P. F.; FERRAZ, E. R. A.; TSUBOY, M. S.; MARCARINI, J. C.; MANTOVANI, M. S.; OLIVEIRA, D. P. The azo dyes disperse red 1 and disperse Orange 1 increase the micronuclei frequencies in human lymphocytes and in HepG2 cells. *Mutation Research*, v. 676, p. 83-86, 2009.

CHO, Y.H.; LEE, J.W.; WOO, H.D. *et al.* Protective Effect of Onion Extract on Bleomycin-Induced Cytotoxicity and Genotoxicity in Human Lymphocytes. Tchounwou PB, ed. *International Journal of Environmental Research and Public Health*. v.13(2), p.227, 2016.

DANTAS, B. B. **Avaliação do efeito anticâncer de compostos sintéticos derivados do núcleo tetraidropirano.** 2014, 99 f. Dissertação de Mestrado - Universidade Federal da Paraíba - PB.

DEARFIELD, K. L.; CIMINO, M. C.; MCCARROLL, N. E.; MAUER, I.; VALCOVIC, L. R. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. *Mutat. Res*, v. 521, p. 121-135, 2002.

DEHN, P.F.; WHITE, C. M.; CONNERS, D. E.; SHIPKEY, G.; CUMBO, T. A. Characterization of the human hepatocellular carcinoma (hepg2) cell line as an in vitro model for cadmium toxicity studies. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*. v. 40, n. 5-6, p. 172-182, 2004.

EISENBRAND, G.; POOL-ZOBEL, B.; BAKER, V.; BLAAUBOER, M. B.; BOOBIS, A.; CARERE, S.; KEVEKORDES, S.; LHUGUENOT, J. C.; PIETERS, R.; KLEINER, J. Methods of in vitro toxicology. *Food and Chemical Toxicology*, v. 40, 193-236, 2002.

FARAG, M. A.; ALI, S. E.; HODAYA, R. H.; EL-SEEIDI, H. R.; SULTANI, H. N.; LAUB, A.; EISSA, T. F.; ABOU-ZAID, F. O. F.; WESSJOHANN, L. A. Phytochemical Profiles and Antimicrobial Activities of *Allium cepa* Red cv. and *A. sativum* Subjected to Different Drying Methods: A Comparative MS-Based Metabolomics. *Molecules*. v.22, p.761, 2017.

FARIAS, M. G.; FAKHOURI, F. M.; CARVALHO, C. W. P.; ASCHERI, L. R. Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola (*Malpighiaemarginata* D. C.). *Química Nova*, v. 35, n. 3, p. 546-552, 2012.

FDA - Food and Drug Administration. Generally recognized as Safe (GRAS). Silver Spring. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/default.htm>> Acesso em: 20 set. 2016.

FENECH, M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay. *Nature Protocols*. v. 2, n. 5, p. 1084-1104, 2007.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: Comparison of LDH, neutral red, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. *Toxicology Letters*. v. 160, p. 171-177, 2006.

FREIRE, V. Embalagem - Embalando o Futuro. *A lavoura*, Rio de Janeiro, n. 711, p. 58-60, 2015.

FREITAS, B. C. **Avaliação do potencial citotóxico do carvacrol sobre células normais e tumorais.** 2010. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Ciências Biológicas) - Universidade Federal da Paraíba - PB.

GRIFFITHS, A. J. F.; GELBART, W. M.; MILLER, J. H.; LEWONTIN, L. C. Mutações gênicas. In: *Genética Humana*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001.

GRIFFITHS, G.; TRUEMAN, L.; CROWTHER, T.; THOMAS, B.; SMITH, B. Onions-A global benefit to health. *Phytother. Res.* v. 16, p. 603–615, 2002.

HARWOOD, M.; DANIELEWSKA-NIKIEL, B.; BORZELLECA, J. F.; FLAMM, G. W.; WILLIAMS, G. M.; LINES, T. C. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. *Food Chem Toxicol*, v. 45, p. 2179 - 2205, 2007.

HENRY, C. M. Nutraceuticaus: fad or trend? *Chem. Eng. News* Nov. 29, 42-47, 1999.

HOSHINA, M. M. SANTOS, L. D; PALMA, M.S.; MARIN=MORALES, M. A. Cytotoxic, genotoxic/antigenotoxic and mutagenic/antimutagenic effects of the venom of the wasp, *Polybia paulista*. *Toxicon*. v. 72, p. 64-70, 2013.

KIRKLAND, D.; ZEIGER, E.; MADIA, F.; CORVI, R. Can *invitro* mammalian cell genotoxicity test results be used to complement positive results in the Ames test and help predict carcinogenic or *in vivo* genotoxic activity? II. Construction and analysis of a consolidated database. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutagen.* v. 775–776, p. 69–80, 2014.

LANZOTTI, V. The analysis of onion and garlic. *Journal of Chromatography A*, v.1112, p.3–22, 2006.

LEE, S.; KIM, J. N.; CHOOND, D. H.; LEE, H. K. Facile Synthesis of trans-S-1-Propenyl-L-Cysteine Sulfoxide (Isoalliin) in Onions (*Allium cepa*). *Bull Korean Chem Soc.* v. 32, p. 319-320, 2011.

LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; GUTIÉRREZ-PRAENA, D.; PUERTO, M.; PICHARDO, S.; MORENO, F. J.; BAÑOS, S.; NUÑEZ, C. GULLAMÓN, E.; CAMEÁN, A. Acute toxicological studies of the main organosulfur compound derived from *Allium* sp. Intended to be used in active food packaging. *FoodChem.Toxicol.* v. 82, p. 1–11, 2015.

MAHADEVAN, B.; SNYDER, R. D.; WATERS, M. D.; BENZ, R. D.; KENPER, R. A.; TICE, R. R.; RICHARD, A. M. Genetic toxicology in the 21st century: reflections and future directions. *Environ Mol Mutagen.* v. 52, p. 339–54, 2011.

MARON, D. M.; AMES, B. N. Revised methods for the *Salmonella* mutagenicity teste. *Mutat. Res.*, v. 113, p. 173-2015, 1983.

MARTINS, N.; PETROPOULOS, S.; FERREIRA, I. C. Chemical composition and bioactive compounds of garlic (*Allium sativum* L.) as affected by pre- and post-harvest conditions: A review. *Food Chemistry.* v. 211, p. 41–50, 2016.

MELLADO-GARCÍA, P.; MAISANABAA, S.; PUERTO, M.; LLANA-RUIZ-CABELLO, M.; PRIETO, A. I.; MARCOS, R.; PICHARDO, S.; CAMEÁ, A. M. Genotoxicity assessment of propyl thiosulfinate oxide, an organosulfur compound from *Allium* extract, intended to food active packaging. *Food and Chemical Toxicology.* v. 86, p. 365-373, 2015.

MELLADO-GARCÍA, P.; MAISANABAA, S.; PUERTO, M.; PRIETO, A. I.; MARCOS, R.; PICHARDO, S.; CAMEÁ, A. M. In vitro toxicological assessment of an organosulfur compound from *Allium* extract: Cytotoxicity, mutagenicity and genotoxicity studies. *Food and Chemical Toxicology.* v. 99, p. 231-240, 2017.

MINE, T. H.; *Fundamentos de toxicologia.* Atheneu, 2 ed. São Paulo, 2003.

MORTELMANS, K.; ZEIGER, E. The Ames *Salmonella*/Microsome Mutagenicity Assay. *Mutat. Res.*, v. 455, p. 29 - 60, 2000.

MOSMANN, T. (1983). Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *Journal of Immunological Methods*, 65(1-2), 55–63.

MURAYYAN, A. I.; MANOHAR, C. M.; HAYWARD, G.; NEETHIRAJAN, SURESH. Antiproliferative activity of Ontario grown onions against colorectal adenocarcinoma cells. *Food Research International.* v. 96, p. 12-18, 2017.

NOZAKI, A. C. M; MARQUES, R. F. C; DINIZ, I. M. A; MARQUES, M. M.; MARCHI, J. Avaliação da citotoxicidade de membranas de colágeno visando a aplicação como

biomaterial. 7º Congresso Latino Americano de Órgãos Artificiais e Biomateriais, 22-25 ago. 2012. Natal, Brasil. Disponível em: <http://www.metallum.com.br/7colaob/resumos/trabalhos_completos/01-218.docx> Acesso em: 25 Outubro. 2017.

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; HURTINGTON, F. W. **Thompson&Thompson Genética Médica**. 6 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 2002, 387 pp.

OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), 1997. **Guideline for Testing of Chemicals: Mutation Test**, p. 1 e 11. Guideline 471.

OECD (Organisation for Economic Cooperation and Development), 2016. **Guideline for Testing of Chemicals: in Vitro Mammalian Cells Micronucleus Test**, p. 1 e 29. Guideline 487.

OLIVEIRA, A. P. S.; SOUSA, J. F.; DA SILVA, M. A.; HILÁRIO, F.; RESENDE, F. A.; CAMARGO, M. S.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Estrogenic and chemopreventive activities of xanthenes and flavones of *Syngonanthus (Eriocaulaceae)*. **Steroids**, v. 78, p. 1053-1063, 2013.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**, 5ed. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 419-433, 2004.

REINOL, F. Tecnologia de Embalagem - Embalagens Comestíveis. **A Lavoura**. Rio de Janeiro, n. 707, p. 28-31, 2015.

RESENDE, F. A.; VILEGAS, W.; DOS SANTOS, L. C.; VARANDA, E. A. Mutagenicity of flavonoids assayed by Bacterial Reverse Mutation (Ames) Test. **Molecules**, v. 17, p. 5255-5268, 2012.

RIETJENS, I. M. C. M.; BOERSMA, M. G.; VAN DER WOUDE, H.; JEURISSEN, S. M. F.; SCHUTTE, M. E.; ALINK, G. M. Flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. **Mutat Res**, v. 574, p. 124 - 138, 2005.

RODRIGUEZ GALDON, B.; RODRIGUEZ RODRIGUEZ, E. M.; DIAZ ROMERO, C. Flavonoids in onion cultivars (*Allium cepa* L.). **J. Food Sci.** v. 73, p. C599–C605, 2008.

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

ROLDÁN-MARÍN, E.; KRATH, B. N.; POULSEN, M.; BINDERUP, M.-L.; NIELSEN, T. H.; HANSEN, M.; BARRI, T.; LANGKILDE, S.; CANO, M. P.; SÁNCHEZ-MORENO, C.; DRAGSTED, L. O. Effects of an onion by-product on bioactivity and safety markers in healthy rats. *British Journal of Nutrition*. v. 102, p. 1574-1582, 2009.

SCHUNK, P. F. T.; KALIL, I. C.; SCHMITT, E. F. P.; LENZ, D.; ANDRADE, T. U.; RIBEIRO, J. S.; ENDRINGER, D. C. ICP-OES and Micronucleus Test to Evaluate Heavy Metal Contamination in Commercially Available Brazilian Herbal Teas. *Biological Trace Element Research*, 2015.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética Toxicológica**. 1ed. Porto Alegre: Alcance, v. 1, p. 103-113, 2003.

SLIMESTAD, R.; FOSSEN, T.; VAGEN, I. M. Onions: A Source of Unique Dietary Flavonoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. v. 55, n. 25, p. 10067-10080, 2007.

STAN, S. D; KAR, S.; STONER, G. D.; *et al.* Bioactive food components and cancer risk reduction. *J Cell Biochem*. v. 104, p. 339–356, 2008.

SULERIA, H. A. R.; BUTT, M. S.; ANJUN, F. M.; SAEED, F. & KHALID, N. Onion: Nature Protection Against Physiological Threats. *Journal Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 55, p. 50-66, 2013.

TAGLIARI, K.C.; CECCHINI, R.; SARIDAKIS, H. O. Teste de Ames como uma ferramenta para detecção de citotoxicidade e mutagenicidade causadas por metais pesados e radicais livres. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. v. 18/19, p. 41-50, 1999.

TEJS, S. The Ames test: a methodological short review. *Enviromental Biotechnology*, v. 4, n. 2, p. 7-14, 2008.

THIERENS, H.; VRAL, A. The micronucleus assay in radiations accidents. *Annalidell'IstitutoSuperiore di Sanità*, Roma, v. 45, n. 3, p. 260-264, 2009.

TOMÁS-BARBERÁN, F.A.; ESPÍN, J.C. Phenolic compounds and related enzymes as determinants of quality in fruits and vegetables. *Journal of Science and Food Agriculture*, n. 81, p. 853-879, 2001.

VAN DER WOUDE, H.; ALINK, G. M.; VAN ROSSUM, B. E. J.; WALLE, K.; VAN STEEG, H.; WALLE, T.; RIETJENS, I. M. C. M. Formation of transient covalent protein and DNA adducts by quercetin in cells with and without oxidative enzyme activity. *Chem Res Toxicol*, v. 18, p. 1907 - 1916, 2005.

VARANDA, E. A. Atividade mutagênica de plantas medicinais. *Rev. Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, v. 27, n.1, p 1-7, 2006.

ZEISEL, S. H. *Science* 285: 1854-1855.

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

WERMES, C.; CANNON, R.; HAASNOOT, S.; COLSTEE, H.; NIEDEVELD, C.; KOOPMANSCHAP, G.; DA COSTA, N. C. Identification of Thiols in Yellow Onion (*Allium cepa* L.) Using Solvent Vented Large Volume Injection GC-MS. *Journal of Food Science*, v.82, p.2606-2613, 2017.