

**APLICAÇÃO DO TESTE DO COMETA PARA AVALIAR OS EFEITOS DA FARINHA DE
FEIJÃO BRANCO SOBRE O DNA DE LINFÓCITOS HUMANOS**

LUCIANA LOPES SILVA PEREIRA¹, LÍVIA CABRAL SÁTIRO²; SILVANA MARCUSSI³,
LARISSA FONSECA ANDRADE⁴, CUSTÓDIO DONIZETE DOS SANTOS⁵

RESUMO

A farinha de feijão branco tem sido largamente utilizada pela população por seus efeitos hipoglicemiantes e emagrecedores provenientes da faseolamina (inibidor de α -amilase). No entanto, apresenta fatores antinutricionais em elevadas concentrações, dentre eles o inibidor de tripsina. Este trabalho foi realizado com o objetivo de avaliar o potencial de indução de efeitos genotóxicos de farinha de feijão branco utilizando o teste do Cometa e adicionalmente propor a utilização do corante iodeto de propídeo em detrimento do brometo de etídio. O teste foi realizado com farinha de feijão branco em três concentrações (3,92; 9,52 e 18,18 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados obtidos mostram que as doses testadas não foram genotóxicas. A substituição do brometo de etídio, geralmente utilizado como corante nesta técnica pelo iodeto de propídeo foi satisfatória. A vantagem desta mudança encontra-se no fato de que o brometo de etídio é mutagênico e, pela característica de iniciador tumoral, sob exposição crônica, pode ser cancerígeno.

Palavras-chaves: Genotoxicidade, Farinha de feijão branco, teste do Cometa.

INTRODUÇÃO

A necessidade de novos fármacos tem estimulado a pesquisa de moléculas que atuem como inibidores enzimáticos e a triagem de substratos e/ou inibidores que se liguem seletivamente às enzimas. Os inibidores protéicos de α -amilase (1-4 α D-glucan-glucanohidrolase, EC 3.2.1.1) são amplamente distribuídos em plantas, principalmente em cereais (trigo e cevada) e feijão. Esta inibição induz tolerância aos carboidratos, saciedade, perda de peso e prolonga o esvaziamento gástrico; efeitos que podem ser úteis no tratamento da obesidade e diabetes mellitus não insulino-dependente (CHEN et al., 2008). O uso cotidiano da farinha de feijão branco, dada a presença do inibidor de α -amilase conhecido como faseolamina, tem se tornado cada vez mais frequente. No entanto, estudos revelam a presença de fatores antinutricionais importantes no feijão cru, dentre eles o inibidor de tripsina (PEREIRA et al., 2009). Os efeitos nocivos dos inibidores de tripsina em animais alimentados com leguminosa crua são complexos.

Estudos com animais monogástricos têm atribuído a estes inibidores efeitos deletérios, principalmente alterações metabólicas do pâncreas (aumento da secreção enzimática, hipertrofia e hiperplasia) e redução da taxa de crescimento. Portanto ao detectar a presença do inibidor de tripsina, constata-se que antes de recomendar o seu uso, deveriam ser investigados os benefícios e malefícios que tal recomendação poderia acarretar (PEREIRA et al., 2009). Neste contexto, objetivou-se verificar a possível indução de danos no DNA de células humanas, utilizando o teste do Cometa, já que não existem trabalhos envolvendo a análise do potencial genotóxico da farinha de feijão branco cru. O teste do cometa é um ensaio simples, rápido, sensível e de baixo custo quando comparado a outros testes para detecção de danos citogenéticos. Esta técnica consiste na imersão de células viáveis em gel de agarose, lise da membrana celular por detergentes e sais alcalinos, e posterior eletroforese. Sob condições alcalinas de eletroforese, as células com danos no DNA apresentam maior taxa de migração

¹ Doutoranda em Química, DQI/ UFLA, lucianalsp@yahoo.com.br

² Iniciação científica, DQI/UFLA liviacsatiro@yahoo.com.br

³ Professora Adjunta, DQI/UFLA, marcussi@dqi.ufla.br

⁴ Professora Adjunta, DPV/CCA-UFES, larissa_lavras@yahoo.com.br

⁵ Professor Adjunto, DQI/UFLA santoscd@dqi.ufla.br

em direção ao ânodo, devido a quebras de fita simples ou dupla e sítios lábeis alcalinos simulando a aparência de um cometa (cabeça e cauda) (PAVÃO et al., 2007). Nesta pesquisa, ainda foi proposta uma nova forma de coloração do DNA contido nas lâminas, substituindo-se o brometo de etídio, geralmente empregado e padronizado na técnica, sendo moderadamente tóxico e altamente mutagênico, por iodeto de propídio.

MATERIAL E MÉTODOS

Preparo da farinha de feijão branco

O feijão branco foi cultivado em Campo Belo, MG, e adquirido em supermercado local. Os grãos com casca foram lavados com água destilada, secos em estufa com circulação de ar a 30°C até peso constante. Para obtenção da farinha, os grãos foram triturados em moinho manual e em seguida em um moinho de facas (TE 631 Tecnal) para obtenção de uma granulometria menor.

Preparo das amostras

O sangue periférico foi coletado de 5 voluntários com idade entre 21 e 40 anos. Foram excluídos da amostra indivíduos tabagistas ou ocupacionalmente expostos a contaminantes ambientais (agrotóxicos, tintas, etc) e aqueles que utilizam medicamentos de uso contínuo. O sangue foi coletado a vácuo e protegido da luz imediatamente após a coleta. Três concentrações (3,92, 9,52 e 18,18 µg/mL) de farinha de feijão branco foram testadas quanto ao seus potenciais genotóxicos. Como controle negativo foi utilizado sangue não tratado. Como controle positivo utilizou-se a doxorubicina a 180,0 µg/mL, um fármaco antitumoral da família das antraciclina muito utilizado em estudos de genotoxicidade em função de sua capacidade de causar danos ao DNA (BARCELOS et al., 2009). As soluções para incubação, por 4 horas em estufa a 37°C, foram preparadas adicionando as amostras do extrato à 500 µL de sangue. Logo em seguida foi realizado o ensaio do Cometa. Todo processo foi realizado em câmara de fluxo laminar e ao abrigo da luz.

Teste do Cometa

O teste do cometa foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Tice et al. (2000), com modificações. As lâminas foram previamente cobertas por solução de agarose de ponto de fusão normal (NMP) a 1%. Esta camada é utilizada para promover a adesão da agarose de baixo ponto de fusão (LMP) contendo as células. Para tanto, uma alíquota (5µL) de cada solução pré-incubada foi misturada a 100 µL de agarose LMP e gotejada sobre a lâmina, coberta com a lamínula (24x60mm) e mantida em baixa temperatura ($\pm 4^{\circ}\text{C}$) por 5min, até solidificação do gel. A seguir, a lamínula foi retirada e as lâminas mergulhadas em solução de lise (2,5M NaCl, 100mM EDTA, 10mM Tris, 1% Triton X-100, 10% DMSO, pH 10), protegidas da luz e deixadas por 24 h à 4 °C. Após esse período, as lâminas foram transferidas para uma cuba contendo solução de eletroforese (1mM EDTA, 300mM NaOH; pH13) e deixadas em geladeira por 20 minutos. A seguir, foram colocadas na posição horizontal na cuba de eletroforese. A cuba foi preenchida com a solução de eletroforese recém-preparada, a um nível superior (0,25cm, em média) às lâminas. Estas ficaram em repouso por 20min para permitir o desenrolamento do DNA, o afrouxamento de suas ligações e a exposição dos sítios álcali-lábeis. A eletroforese foi conduzida a 4°C com 25V e 300mA por 30min. Após a eletroforese, as lâminas foram retiradas da cuba e mergulhadas na solução tampão de neutralização (0,4M tris; pH 7,5) por 15min. Após secarem, foram fixadas com etanol 100% por 3 minutos. Posteriormente, foram coradas com 50µL de solução de iodeto de propídio 2,5 µg/mL e cobertas com lamínula e visualizadas no microscópio de fluorescência Nikon Eclipse E400. Foram analisadas 100 células por lâmina, 4 lâminas por indivíduo totalizando 2000 células por tratamento em aumento de 400 X.

Análise estatística

Os resultados foram avaliados estatisticamente mediante a Análise de Variância (ANAVA) e as médias comparadas entre si através do teste de Scot Knott ao nível de 5% de significância com auxílio do software SISVAR (FERREIRA, 2000).

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com o ensaio do Cometa realizado conforme descrito na metodologia foram obtidos resultados animadores, ou seja, a quantidade de quebras de DNA induzidas pela farinha de feijão branco nas doses de 3,92; 9,52 e 18,18 $\mu\text{g mL}^{-1}$ foram estatisticamente iguais ao controle negativo (tabela 1). A farinha de feijão branco, mesmo na concentração mais alta foi incapaz de ocasionar danos significativos em nível de DNA. Isso nos leva a crer que a farinha de feijão branco encontra-se no perfil de substâncias que não causam efeitos genotóxicos e consequentemente mutagênicos ao DNA.

Tabela 1 Média do número de células por classe de cometa após tratamento com diferentes concentrações de solução aquosa de farinha de feijão branco (FFB).

% Dano	Controle (-)	Controle (+)*	FFB (3.92 $\mu\text{g/mL}$)	FFB (9.52 $\mu\text{g/mL}$)	FFB (18.18 $\mu\text{g/mL}$)
Classe 0 (dano < 5%)**	66,08 a ²	0,25 a ¹	76,13 a ²	46,29 a ²	49,52 a ²
Classe 1 (dano 5-20%)**	31,20 b ²	3,83 b ¹	23,42 b ²	48,03 b ²	36,37 b ²
Classe 2 (dano 20-40%)**	2,72 c ¹	38,23 c ²	0,45 c ¹	5,68 c ¹	10,43 c ¹
Classe 3 (dano 40-85%)**	0,00 d ¹	42,82 d ²	0,00 d ¹	0,00 d ¹	3,68 d ¹
Classe 4 (dano > 85%)**	0,00 e ¹	14,87 e ²	0,00 e ¹	0,00 e ¹	0,00 e ¹

Os resultados acima representam as médias dos valores obtidos em 3 ou 4 lâminas. 100 nucleóides foram analisados em cada lâmina, sendo 3-4 lâminas/tratamento/voluntário. Foram utilizados 5 voluntários (1 voluntário/experimento).

* Controle positivo = doxorubicina (DXR) 18,0 $\mu\text{g/mL}$.

** Os valores com as mesmas letras sobrescritas não diferem entre si, em nível de 5% de significância, pelo teste de Scot Knott

Os danos causados ao DNA são passíveis de reparo, e o ensaio do Cometa é um “retrato” da célula em um dado momento antes da atuação dos mecanismos de reparo celular (FERRARO, 2009). Ensaio analisando o uso crônico da farinha de feijão branco são uma perspectiva interessante para se avaliar a possível ocorrência de dano cumulativo, já que é plausível sugerir que eventuais danos podem não ser reparados e trazer algum prejuízo às células e ao indivíduo.

A substituição do brometo de etídio, geralmente utilizado como corante nesta técnica pelo iodeto de propídio foi satisfatória. A vantagem desta mudança encontra-se no fato de que o brometo de etídio é mutagênico e, pela característica de iniciador tumoral, sob exposição crônica, pode ser cancerígeno. A manipulação do brometo de etídio exige local específico isolado, deixando resíduos que podem contaminar o ambiente e as vidrarias utilizadas.

CONCLUSÃO

As doses de FFB testadas não foram genotóxicas considerando as 4 horas em que as células foram submetidas a presença dos tratamentos, todavia é prematura a recomendação quanto a eventuais riscos ou benefícios para a saúde humana, pois estudos adicionais de toxicidade, eficácia e segurança são necessários. A substituição do brometo de etídio pelo iodeto de propídio na coloração das lâminas mostrou-se factível e de boa reprodutibilidade na análise visual.

REFERENCIAL BIBLIOGRÁFICO

BARCELOS, G. R.; ANGELI, J. P.; SERPELONI, J. M.; ROCHA, B. A.; MANTOVANI, M. S.; ANTUNES, L. M., Effect of annato on micronuclei induction by direct and indirect mutagens in HepG2 cells. **Environmental and molecular mutagenesis**, New York, v.50, n.9, p. 808-814, 2009.

CHEN, X.; XU., G.; LI, X.; LI, Z.; YING. Purification of an alpha amylase inhibitor in a polyetilene glycol / fructose-1,6-bisphosphate trisodium salt aqueous two-phase system. **Process Biochem.**, v. 43, 765, 2008.

FERRARO, M. V. M. **Avaliação de três espécies de peixes – *Rhamdia quelen*, *Cyprinus carpio* e *Astyanax bimaculatus*, como potenciais bioindicadores em sistemas hídricos através dos ensaios: cometa e dos micronúcleos.** 2009, 176f. Tese (Doutorado em Genética) Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2009.

FERREIRA, D. F. Análises estatísticas por meio do SISVAR para Windows versão 4.0. In: REUNIÃO BRASILEIRA DA SOCIEDADE INTERNACIONAL DE BIOMETRIA, 45., 2000, São Carlos. **Resumos...** São Carlos: UFSCar, 2000. p. 235.

PAVÃO, P. R. G.;GONTIJO, A. M. M. C.; RIBEIRO, D. A.; SALVADORI, D. M. F. Ausência de efeito genotóxico induzido por esteróides anabolizantes em indivíduos fisiculturistas. **Revista brasileira de Educação Física e Esportes**. São Paulo, v.21, n.1, p.5-10, jan./mar. 2007

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; CORRÊA, A. D.; SOUSA, R. V. Estudo Comparativo entre Inibidor de a-amilase (Faseolamina) Comercial e Farinha de Feijões Branco, Preto e Carioca. **Infarma**, Brasília, v.21, nº 11/12, p. 11-14, 2009.

TICE, R.R.; AGURELL, E.; ANDERSON, D.; BURLINSON, B.; HARTMANN, A.; KOBAYASHI, H.; IYAMAE, Y.; ROJAS, E.; RYU, J.C.; SASAKI, Y.F. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, New York, v.35, p.206-21, 2000.