

Nivea Dulce Tedeschi Conforti Froes

**Avaliação de Efeitos Cicloativo e Clastogênico
do Corante da Beterraba (Beta Vulgaris) em
Células de Medula Ossea de Rattus
Norvergicus**



NIVEA DULCE TEDESCHI CONFORTI FROES

AVALIAÇÃO DE EFEITOS CICLOATIVO E CLASTOGENICO DO CORANTE DA
BETERRABA (Beta vulgaris) EM CELULAS DE MEDULA OSSEA DE
Rattus norvergicus.

Tese apresentada para obtenção do
grau de Doutor em Ciências (Área
Genética) no curso de Pós-Graduação
em Ciências Biológicas, área de
Concentração em Genética, do
Instituto de Biociências, Letras e
Ciências Exatas da Universidade
Estadual Paulista "Júlio de
Mesquita Filho".

SÃO JOSE DO RIO PRETO

1988



636/94



Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Botânica e Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Comissão de Projetos Especiais (CPE, UNESP).

Orientador: Profa. Dra. Marileila Varella-Garcia



Este trabalho foi realizado nos Departamentos de Botânica e Biologia do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas de São José do Rio Preto, da Universidade Estadual Paulista "Julio de Mesquita Filho", com auxílio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Comissão de Projetos Especiais (CPE, UNESP).



Dedico a todas as mulheres que,
operárias da ciência e da vida, se
incumbem da difícil tarefa de criar.

"Peço na minha oração que a vossa caridade cresça cada vez mais em
ciência e em inteligência para que possais discernir o que é melhor"

(Filipenses I, 9)



AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Marileila Varela Garcia, pela orientação segura e pela confiança que depositou desde o início da minha vida profissional.

A Profa. Dra. Heralone Elly Melara de Campos Bicudo, pelo exemplo a ser seguido, pela disponibilidade em assumir a orientação quando da ausência da Profa. Dra. Marileila.

"Qualquer ação, por menor que seja, é um imenso acontecimento. Não importa o que fazemos; segurar uma vassoura ou uma caneta; falar ou calar; fazer um conserto ou uma conferência; cuidar de um doente ou escrever a máquina. Tudo é apenas o exterior de uma realidade esplêndida, o encontro da alma com Deus".

Ao Prof. Dr. Aluísio José Gallo, chefe do Departamento de Biologia, pelas lições de perseverança.

Madeleine Delbrel

Ao Prof. Dr. Wladimir José Taddai, coordenador do curso de Pós-Graduação.

A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.

Ao Prof. Antonio José Manzatto, do Departamento de Análises Numéricas e Estatística deste Instituto, pela orientação na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Carlos Deghlian, do Departamento de Letras Modernas deste Instituto, pela revisão do Summary.

Aos meus colegas dos Departamentos de Biologia e Botânica, pela amizade.

AGRADECIMENTOS

A Profa. Dra. Marileila Varella Garcia, pela orientação segura e pela confiança que depositou desde o início da minha vida profissional.

A Profa. Dra. Hermione Elly Melara de Campos Bicudo, sempre um exemplo a ser seguido, pela disponibilidade em assumir a orientação quando da ausência da Profa. Dra. Marileila.

Ao Prof. Dr. Celso Abbade Mourão, pela sua dedicação à vida científica e pelo seu empenho em acompanhar todo o desenvolvimento do curso de Pós-Graduação.

A Profa. Dra. Eurides Mambreu, chefe do Departamento de Botânica, pela compreensão e apoio no decorrer deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Aluisio José Gallo, chefe do Departamento de Biologia, pelas lições de perseverança.

Ao Prof. Dr. Wladimir João Taddei, coordenador do curso de Pós-Graduação.

A Direção do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas, pela disposição das condições materiais.

Ao Prof. Antonio José Manzatto, do Departamento de Análises Numéricas e Estatística deste Instituto, pela orientação na análise estatística.

Ao Prof. Dr. Carlos Daghlían, do Departamento de Letras Modernas deste Instituto, pela revisão do Summary.

Aos meus colegas dos Departamentos de Biologia e Botânica, pela amizade.

A Dra. Seiva Cascon, do Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias, pelo interesse demonstrado desde o nosso primeiro contato.

As funcionárias da biblioteca deste Instituto, pela presteza no serviço de Comutação Bibliográfica.

A Maria Helena Carabolante, funcionária exemplar do Departamento de Botânica, pelos serviços técnicos prestados.

Aos técnicos do Laboratório de Citogenética, Josué Rodrigues dos Santos e Rosana Silistino.

Aos graduandos Spencer Marques Payão, Adriana Madeira da Silva e Denise Crispim Tavares e às mestrandas Elza Hashimoto e Rosa Kawasaki pela inestimável colaboração.

Aos membros da Comissão Examinadora, Dra. Maria Nazareth Rabello-Gay, Dra. Maria Amélia La Regina Rodrigues, Dra. Maria Cecília Toledo e Dra. Maria Astride Saad Corradi, pela análise minuciosa deste trabalho.

A Profa. Marina Andreucci Coleman, pelo carinho e amizade cultivados nesses anos de convivência.

Ao colega Edson Guilherme Vieira, pelas valiosas sugestões.

Ao graduando Marcelo Ferreira Lourenço, pela dedicação e disponibilidade com que executou o serviço de digitação.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação.

Aos meus pais, pela dedicação e amor que sempre nortearam a educação de seus filhos.

Aos meus sogros, pelo apoio e carinho.

Aos meus amores, Paulo e João Paulo, pela resignação com que aceitaram minha ausência e as mudanças decorrentes do trabalho científico.

Aos meus irmãos, cunhados e sobrinhos, cujo amor e união fazem esquecer todos os momentos difíceis.

Ao Pai Maior, pela alegria de viver.

1. Corantes para alimentos.....	14
4. Avaliação de toxicidade de componentes alimentares.....	23
OBJETIVOS.....	27
II. MATERIAL E MÉTODOS.....	28
1. Preparações de microndíscos.....	30
2. Preparações de medula óssea.....	31
III. RESULTADOS.....	
1. Microndíscos.....	35
2. Índice mitótico.....	42
3. Anomalias cromossômicas.....	46
IV. DISCUSSÃO.....	59
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	72
VI. SUMMARY.....	74
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76

INDICE

I. INTRODUÇÃO.....	1
1. Ação biológica dos produtos naturais secundários.....	3
2. Aditivos para alimentos.....	10
3. Corantes para alimentos.....	14
4. Avaliação de toxicidade de componentes alimentares.....	23
OBJETIVOS.....	27
II. MATERIAL E METODOS.....	28
1. Preparações de micronúcleos.....	30
2. Preparações de medula óssea.....	31
III. RESULTADOS	
1. Micronúcleos.....	35
2. Índice mitótico.....	42
3. Anomalias cromossômicas.....	48
IV. DISCUSSÃO.....	59
V. RESUMO E CONCLUSÕES.....	72
VI. SUMMARY.....	74
VII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	76

1. INTRODUÇÃO

"Nós vivemos em um mundo químico ... um mundo dominado por sinais químicos conferidos pela cor, pelo aroma e pelo sabor" (GOODWIN, 1976).

Para a maioria dos organismos vivos, os sinais químicos são o principal meio de comunicação. Esses sinais, entretanto, são complexos e contêm misturas de diferentes substâncias, grande parte das quais pertence à categoria dos produtos do metabolismo secundário vegetal. Esses produtos foram assim designados porque nem todos possuem função metabólica específica, o que levou inicialmente à idéia errônea de que fossem de pouca utilidade (SWAIN, 1977).

A maior parte dos produtos secundários, também comumente referidos como produtos naturais, é originada de vegetais superiores, embora muitos possam ser encontrados em fungos e bactérias (TURNER, 1971, DE LEY & KERSTERS, 1975). Existem cerca de dez mil produtos secundários de baixo peso molecular; como exemplo, têm-se as classes dos alcalóides, com cerca de 4500 estruturas conhecidas, dos flavonóides, que agrupam aproximadamente 1200 estruturas, dos terpenos, com perto de 1100 estruturas conhecidas e dos carotenóides, com cerca de 300 estruturas já identificadas. Entre os produtos secundários são também encontrados proteínas, polissacarídeos e outros polímeros cuja função nas plantas não é ainda conhecida (MAZLIAK, 1968; MALONE, 1983).



Na verdade, embora os produtos secundários não pareçam essenciais em processos bioquímicos celulares particulares, eles têm mostrado uma função especial no organismo vegetal como um todo. Uma das funções mais surpreendentes é a emissão de sinais químicos no ecossistema como mecanismo de proteção contra patógenos e predadores. SWAIN (1977) considerou esta como a função principal dos metabólitos secundários e suficiente para explicar satisfatoriamente a diversidade de estrutura, a evolução, a localização específica nas plantas e a rapidez do metabolismo e transporte dessas substâncias.

Durante as duas últimas décadas, muitos cientistas dedicaram-se ao estudo dos produtos do metabolismo secundário, não só para elucidar a sua complexa estrutura, mas também para entender as vias biossintéticas pelas quais são originados.

A pesquisa em busca de substâncias úteis extraídas de vegetais iniciou-se em 1804, quando a morfina foi separada do látex seco de Papaver somniferum L. A partir daí, muitos produtos derivados de vegetais foram identificados como portadores de importantes princípios ativos, geralmente tendo sido selecionados para estudo pelo conhecimento popular. Constituem exemplos disso a reserpina, o quinino, a digitoxina e a codeína.

Em suma, a maior parte dos produtos naturais exibe características específicas, qual seja, a de possuírem princípios ativos farmacológicos importantes na terapia animal e humana. Todavia, em muitos casos, esses princípios ativos são tóxicos, podendo ser letais ou causarem danos por interagirem com as moléculas de informação genética (DNA, RNA e proteínas) e podendo resultar em um processo maligno, a curto ou a longo prazo.



1. Ação biológica dos produtos naturais secundários.

Nos últimos anos, tem se tornado cada vez mais evidente que os fatores ambientais desempenham um papel fundamental na mutagênese e na carcinogênese (WHO,1964). As pesquisas epidemiológicas têm revelado variações intra e inter-populacionais na incidência de câncer (AMES,1984b), sendo que as causas são atribuídas a fatores genéticos, físicos e principalmente químicos, aos quais estamos expostos intencionalmente ou não. Mais recentemente, a alimentação passou a centralizar a atenção de pesquisadores como sendo uma das grandes contribuidoras para a elevada incidência de neoplasmas na população humana (SOMOGYI,1980). Essa preocupação crescente adveio do fato dos alimentos conterem, além dos compostos intencionalmente adicionados, uma grande quantidade de compostos do metabolismo secundário vegetal, muitos dos quais com atividade mutagênica e carcinogênica.

Anteriormente, acreditava-se que esses compostos só afetavam as populações de países como a Polinésia, Japão e Índia, que têm hábitos alimentares exóticos (STICH et alii,1982). Atualmente sabe-se que qualquer pessoa, independente de ser vegetariana ou carnívora, ingere diariamente muitos tipos de mutagênicos amplamente distribuídos no reino vegetal.

O aparecimento de tumores em animais, induzidos por compostos naturais ou sintéticos, é considerado um processo de muitos estádios (BERENBLUM,1941; ROUS & KIDD, 1941) e é denominado de carcinogênese química. Muitos compostos necessitam de ativação metabólica para tornarem-se mutagênicos finais e ligarem-se às moléculas de informação genética, sendo referidos como eletrófilos reativos.



Após um tempo variável, denominado período de latência, as células alteradas expressam características fenotípicas novas que resultam em um padrão de crescimento celular alterado. Os eventos bioquímicos pelos quais as células expressam essas propriedades de crescimento alterado são desconhecidos; todavia, podem estar envolvidos fatores nutricionais. Em primeiro lugar, o tipo de dieta pode influenciar a ocorrência, a dose e a exposição a compostos mutagênicos e carcinogênicos. Em segundo lugar, os constituintes da dieta podem regular a atividade de enzimas ativadoras e inativadoras desses compostos, como as monoxigenases de função mista, geralmente localizadas no retículo endoplasmático da célula (Figura 1).

Entre os compostos secundários que ocorrem amplamente nas partes comestíveis de vegetais, dos quais têm-se identificado propriedades mutagênicas e carcinogênicas, estão os alcalóides, que são moléculas orgânicas que contêm nitrogênio usualmente em um anel heterocíclico, o qual age como base devido a sua capacidade em aceitar íons hidrogênio. Assim, as soluções de alcalóides são em geral fortemente básicas. Os alcalóides recebem denominações específicas dependendo dos aminoácidos dos quais são derivados. Desse modo, os alcalóides securínicos e piridínicos são os derivados da niacina ou ácido nicotínico, os imidazólicos são derivados da histidina, os benzilisoquinolínicos da fenilalanina, os tropanícos, pirrolidínicos e indolizidínicos da lisina.

O papel dos alcalóides ainda não é bem conhecido; todavia, sua importância na indústria farmacêutica é indiscutível e o uso de plantas ricas em alcalóides na medicina popular, principalmente em chás de cascas de caules, folhas ou sementes, é amplo.



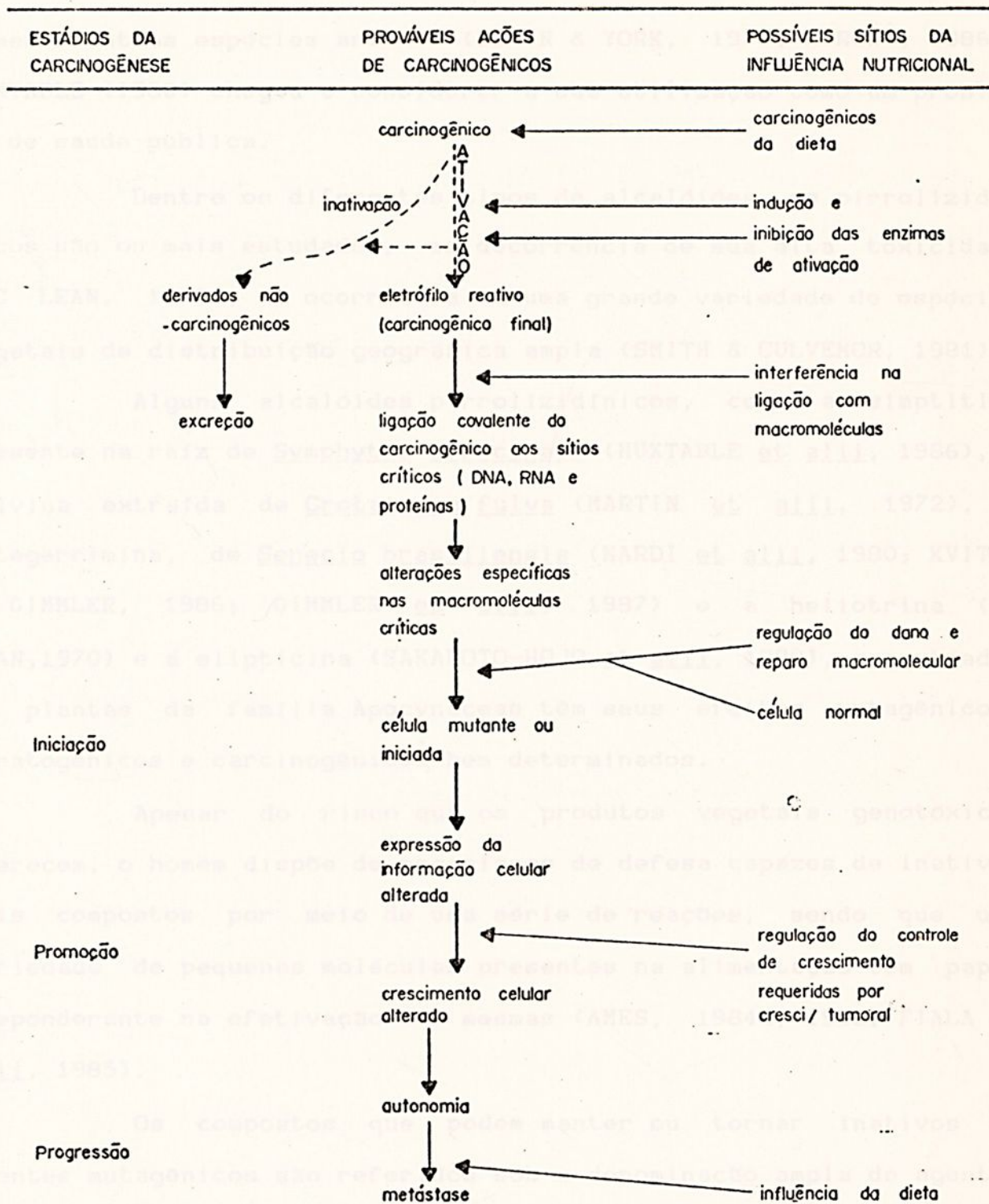


FIGURA 1 - Relação entre os constituintes da dieta e o desenvolvimento do processo neoplásico, (modificado de Carr, 1985).

Por outro lado, muitos deles apresentam efeitos mutagênicos para o homem e outras espécies animais (LEVIN & YORK, 1978; HIRONO, 1986). HUXTABLE (1980) chegou a considerar a sua utilização como um problema de saúde pública.

Dentre os diferentes tipos de alcalóides, os pirrolizidínicos são os mais estudados, em decorrência de sua alta toxicidade (MC LEAN, 1970), e ocorrência em uma grande variedade de espécies vegetais de distribuição geográfica ampla (SMITH & CULVENOR, 1981).

Alguns alcalóides pirrolizidínicos, como a simplitina presente na raiz de Symphytum officinale (HUXTABLE et alii, 1986), a fulvina extraída de Crotalaria fulva (MARTIN et alii, 1972), a integerrimina, de Senecio brasiliensis (NARDI et alii, 1980; KVITKO & GIMMLER, 1986; GIMMLER et alii, 1987) e a heliotrina (MC LEAN, 1970) e a elipticina (SAKAMOTO-HOJO et alii, 1988), encontradas em plantas da família Apocynaceae têm seus efeitos mutagênicos, teratogênicos e carcinogênicos bem determinados.

Apesar do risco que os produtos vegetais genotóxicos oferecem, o homem dispõe de mecanismos de defesa capazes de inativar tais compostos por meio de uma série de reações, sendo que uma variedade de pequenas moléculas presentes na alimentação tem papel preponderante na efetivação das mesmas (AMES, 1984a; 1986; FIALA et alii, 1985).

Os compostos que podem manter ou tornar inativos os agentes mutagênicos são referidos sob a denominação ampla de agentes antimutagênicos. Segundo KADA et alii (1985), eles podem atuar in vitro, quando são designados desmutagênicos, ou in vivo quando são denominados bioantimutagênicos. Os agentes antimutagênicos podem



interferir nas reações que culminam por lesar o material genético de diferentes modos (Figura 2). Eles podem impedir as reações da fase I de metabolização, na qual os agentes promutagênicos ou mutagênicos secundários são ativados a formas finais altamente eletrofílicas, a ação de enzimas de conjugação (fase II) que inativam os compostos por removerem os radicais ativos superóxido, peróxido de hidrogênio e hidroxilo, formados durante as reações de óxido-redução, ou interferir nas reações de duplicação e reparo do DNA.

Dentre os compostos naturais de origem vegetal que agem na fase I, pode-se citar os fenóis como o ácido p-hidroxicinâmico e o ácido o-hidroxicinâmico, obtidos da canela e folhas de coqueiro (WATTENBERGER *et alii*, 1980), e os compostos indólicos, entre eles o indol-3-carbinol, o 3-3'-diindolil-metano e o indol-3-acetonitrilo, formados a partir de glicobrassicina, um glicosídeo do óleo de mostarda com um grupo indol na molécula. Tais compostos ocorrem nas partes comestíveis de vegetais da família Cruciferae como a couve, a couve-flor e o brócolis (WATTENBERG & LOUB, 1978). Tanto os fenóis como os indóis são capazes de alterar a atividade das mono-xigenases de função mista, enzimas envolvidas no metabolismo oxidativo de muitos compostos químicos.

As reações da fase II do processo de metabolismo de compostos químicos (reações de conjugação) caracterizam-se pela destoxificação enzimática dos metabólitos do composto, que são convertidos em derivados não mutagênicos que são excretados.

Os agentes antimutagênicos que participam da remoção de radicais ativos são referidos por SLATER *et alii* (1987) como antioxidantes removedores de radicais ou como preventivos. No primeiro



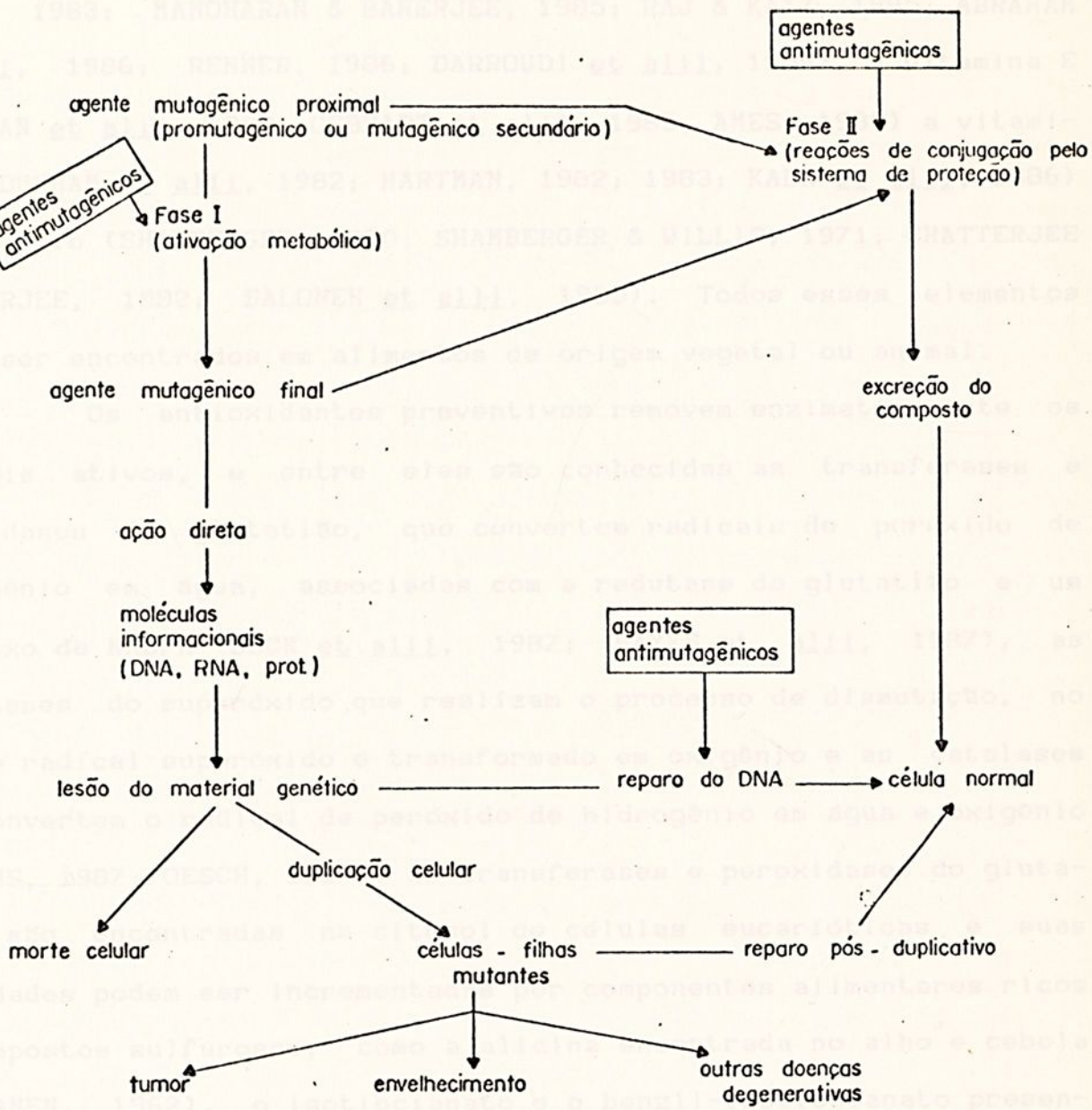


FIGURA 2 - Metabolismo dos agentes mutagênicos e sua relação com os antimutagênicos
(modificado de CARR, 1985)

caso, são exemplos o caroteno ou provitamina A (PETO *et alii*, 1981; HICKS, 1983; MANOHARAN & BANERJEE, 1985; RAJ & KATZ, 1985; ABRAHAM *et alii*, 1986; RENNER, 1986; DARROUDI *et alii*, 1988), a vitamina E (BECKMAN *et alii*, 1982; GEBHART *et alii*, 1985; AMES, 1986) a vitamina C (DUNHAM *et alii*, 1982; HARTMAN, 1982; 1983; KADA *et alii*, 1986) e o selênio (SHAMBERGER, 1970; SHAMBERGER & WILLIS, 1971; CHATTERJEE & BANERJEE, 1982; SALONEN *et alii*, 1985). Todos esses elementos podem ser encontrados em alimentos de origem vegetal ou animal.

Os antioxidantes preventivos removem enzimaticamente os radicais ativos, e entre eles são conhecidas as transferases e peroxidases do glutatião, que convertem radicais de peróxido de hidrogênio em água, associadas com a redutase do glutatião e um complexo de NADPH (BOCK *et alii*, 1987; HAYES *et alii*, 1987), as dismutases do superóxido que realizam o processo de dismutação, no qual o radical superóxido é transformado em oxigênio e as catalases que convertem o radical de peróxido de hidrogênio em água e oxigênio (KAPPUS, 1987; OESCH, 1987). As transferases e peroxidases do glutatião são encontradas no citosol de células eucarióticas e suas atividades podem ser incrementadas por componentes alimentares ricos em compostos sulfurosos, como a alicina encontrada no alho e cebola (VIRTANEN, 1962), o isotiocianato e o benzil-isotiocianato presentes, respectivamente, no óleo de mostarda e no agrião (WATTENBERG, 1977). As dismutases do superóxido são específicas para o citosol e mitocôndrias de eucariotos e são encontradas abundantemente em muitas espécies vegetais (FRIDOVICH, 1982), as catalases estão presentes em todas as células aeróbicas (VIULLAUME, 1987).

Entre os compostos que agem na duplicação e reparo do DNA estão os derivados de taninos, compostos do metabolismo secundário



vegetal conhecidos pela sua ação adstringente e anti-putrefativa. KADA *et alii* (1985) isolaram de *Camellia sinensis* uma catecolamina identificada como epigallocateconagalato, que reduziu significativamente as taxas de mutação espontânea devidas às alterações na DNA-polimerase III de uma linhagem mutante de *Bacillus subtilis*. Segundo os autores, como as catecolaminas e outros taninos têm afinidade com proteínas, parece que o efeito da epigallocateconagalato foi devido a uma interação específica com a DNA-polimerase III, o que garantiu a fidelidade na duplicação do DNA.

Um outro derivado dos taninos, o ácido tanínico, promoveu o reparo por excisão de danos induzidos por ultra-violeta (U.V.) em *Escherichia coli*, sendo que esse agente mostrou-se um bioantimutagênico específico para U.V. (SHIMO *et alii*, 1985).

2. Aditivos para alimentos.

Os nossos mais remotos ancestrais dependiam, para sua sobrevivência, de frutos selvagens, sementes, raízes, insetos, mel e animais. Eles aprenderam a evitar algumas plantas venenosas observando o que ocorria com os animais que as ingeriam.

TAYLOR (1980) já havia destacado como bastante provável que os sobreviventes tenham chegado a reconhecer não somente aquelas plantas com efeitos letais, e os mais inescrupulosos entre eles a usá-las para conquistar o poder, mas também aquelas que os faziam adoecer. O que eles não fizeram, nem tampouco o homem moderno ainda o fez convenientemente, foi identificar as plantas comestíveis que têm efeitos tóxicos retardados.



Até a década de 70, as preocupações estavam voltadas para a seleção de contaminantes alimentares sintéticos, negligenciando-se os compostos mutagênicos e carcinogênicos de ocorrência natural que, então, começaram a despertar a atenção dos pesquisadores (KNUDSEN, 1982).

Os contaminantes alimentares com atividade genotóxica podem ter fontes de origem intencional e não intencional. Os compostos de ocorrência natural como os produtos do metabolismo secundário vegetal referidos, ou compostos originados de componentes naturais dos alimentos são considerados de fontes não intencionais. Estes podem originar-se por reações in vivo, como as nitrosaminas, formadas de reações entre os nitritos provenientes dos alimentos, e as aminas que são componentes celulares essenciais, ou durante o preparo e transporte dos alimentos, como as várias aminas aromáticas heterocíclicas, descritas primeiramente por SUGIMURA et alii (1977). De fontes intencionais são encontradas substâncias não nutritivas adicionadas quase sempre deliberadamente aos alimentos com uma finalidade específica. Entre essas, são exemplos bem atuais Os aditivos alimentares.

Pela FAO/WHO (1957), aditivo alimentar é "toda substância ou mistura de substâncias, dotada ou não de valor nutritivo, adicionada ao alimento com a finalidade de impedir alterações, manter, conferir ou intensificar seu aroma, cor, sabor, modificar ou manter seu estado físico geral ou exercer qualquer ação exigida para uma boa tecnologia de fabricação do alimento".

Os aditivos para alimentos são divididos em classes, de acordo com sua função. São designadas acidulantes as substâncias capazes de intensificar o grau de acidez dos alimentos. Umectantes e



antiumectantes são substâncias adicionadas aos alimentos com a finalidade de "capturar" a água, respectivamente repassando-a para o produto de modo a mantê-lo úmido ou imobilizando-a a fim de manter o alimento seco. São designadas espessantes as substâncias capazes de aumentar a viscosidade de soluções, emulsões e suspensões. Substâncias com a propriedade de conferir ou intensificar a cor são chamadas corantes, os intensificadores do aroma são os aromatizantes e os intensificadores do sabor e aroma são flavorizantes. Os edulcorantes são substâncias com propriedade de adoçar os alimentos e os antioxidantes são protetores contra a oxidação, que é o principal fator envolvido na deterioração dos componentes lipídicos. Os conservantes são substâncias que impedem ou retardam a alteração dos alimentos por microrganismos.

A preocupação em proteger os consumidores em relação à adulteração dos alimentos é muito antiga. Na Inglaterra, desde 1266 foram criadas medidas oficiais de proteção aos consumidores; entretanto, entre os séculos treze e dezenove, tais medidas foram ineficazes porque não se dispunha de métodos convenientes para avaliar a segurança alimentar, o que só se tornou possível no fim do século dezenove com o desenvolvimento da Química Analítica (BUNYAN *et alii*, 1984). Em 1948, foi criada nos Estados Unidos a Organização Mundial de Saúde (WHO), instituição especializada que reúne mais de 140 países, com o objetivo de elevar ao melhor possível o nível de saúde da população humana. A Organização para Alimentos e Agricultura (FAO) é uma ramificação da Organização Mundial de Saúde e foi criada em 1956 com o objetivo de controlar a qualidade dos alimentos. Ambas estabeleceram, em 1962, a Comissão do Codex Alimentarius, que formou



um grupo subsidiário, o Comitê Misto FAO/WHO de Peritos em Aditivos para Alimentos (JECFA). A Comissão do Codex Alimentarius é um órgão intergovernamental que se reúne anualmente para considerar recomendações do Comitê de Peritos concernentes ao nível de uso de aditivos apropriados a cada tipo de alimento e especificar a identidade, a pureza e os métodos de análise desses aditivos. E também de sua responsabilidade a seleção dos aditivos a serem examinados toxicologicamente e genotoxicologicamente pela Junta de Peritos, para o estabelecimento da dosagem aceita para ingestão diária (IDA), expressa em miligrama do composto adicionado aos alimentos por quilograma de peso corpóreo. A IDA significa a quantidade de um aditivo alimentar que pode ser ingerida por toda a vida, sem qualquer dano à saúde humana, à luz das informações toxicológicas disponíveis na época da avaliação (JECFA, 1967).

Outros países, como a Inglaterra, têm suas próprias legislações e, para alguns aditivos, as listas elaboradas são mais rigorosas do que as publicadas pela JECFA/FAO/WHO. Nesse país, as listas de aditivos alimentares são elaboradas e controladas quanto à toxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade pelo Comitê sobre Toxicidade de Químicos em Alimentos, do Departamento de Saúde e Segurança Social (DHSS).

O emprego de aditivos em alimentos no Brasil é basicamente regulado pelo Decreto no. 55871 de 26 de março de 1965. As alterações desse decreto foram feitas através de resoluções da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA), a qual foi sucedida pela Câmara Técnica de Alimentos do Conselho Nacional de Saúde. Atualmente, eventuais modificações vêm sendo realizadas através de portarias da Diretoria da Divisão Nacional de Vigilância Sanitária de Alimentos (DINAL), do Ministério da Saúde (ANTUNES &



CANHOS, 1986).

A lista de aditivos cresceu muito nos últimos anos, mostrando grande mudança nos hábitos alimentares. No início do presente século não existiam mais do que cinquenta aditivos, e atualmente quatro mil itens estão relacionados, sem contar com os componentes flavorizantes de ervas e especiarias. No entanto, muitos dos aditivos alimentares têm seu uso proibido pela Organização Mundial de Saúde e outros ainda requerem estudos para serem conhecidas as doses seguras de ingestão diária.

3. Corantes para alimentos

Dentre os aditivos para alimentos, a classe dos corantes é a que tem sido mais cuidadosamente avaliada do ponto de vista toxicológico (KLAUI, 1980) e causado maior polêmica entre os cientistas (NOONAN, 1977), principalmente porque a grande maioria é responsável por reações alérgicas (JUHLIN, 1983), tóxicas (HANSEN *et alii*, 1963), genotóxicas (ANDRIANOVA, 1970) e teratogênicas (COLLINS *et alii*, 1972), com o agravante de não acrescentarem nada ao produto alimentício, do ponto de vista nutricional (ANTUNES & CANHOS, 1986).

No entanto, a cor dos alimentos é um dos fatores de grande influência em sua aceitabilidade (KLAUI, 1980) e, desde 1960, a Food and Drug Administration (FDA) havia considerado os corantes como desejáveis e necessários (CLYDESDALE, 1977).

Seu emprego na alimentação é muito antigo, sendo citado o uso de corantes artificiais no vinho em registros do erudito romano



Phiny, há dois mil anos. A regulamentação de seu emprego também não é recente, havendo referências de proibição do uso de corantes artificiais na fabricação de manteiga, pelo governo de Paris em 1395 (SCHAFFNER, 1977).

Até a metade do século dezenove, os corantes disponíveis para adição aos alimentos eram, em sua maioria, limitados aos de origem vegetal ou animal. Em 1856, Perkin descobriu o corante que denominou de anilina púrpura, o primeiro exemplo de tintura pertencente ao grupo químico azo ($N=N$) e derivada do naftaleno, também manufaturado. Tal descoberta levou à pesquisa imediata de outros corantes sintéticos (SCHAFFNER, 1977).

Atualmente, a indústria de alimentos dispõe de quatro tipos de corantes: o orgânico natural, designado pelo código C.I, o orgânico sintético, designado pelo código C.II, o orgânico sintético idêntico ao natural, designado pelo código C.III, e o inorgânico, que engloba pigmentos cujo emprego é limitado à superfície, designado pelo código C.IV. A lista de corantes permitidos dos tipos C.II e C.III, inclui não só corantes com ingestão diária aceitável (IDA) estabelecida, como por exemplo o cantaxanteno, o amaranto, o carmin indigo e o Red 2G, mas também alguns que ainda requerem informações de testes de longa duração, como o chocolate Brown HT e o amarelo quinolina. Diversos outros corantes, como o Orange B e o Citrus Red no.2 permanecem sem autorização para uso por não terem suas IDAs determinadas e serem de comprovada toxicidade, mesmo em concentrações baixas. Esses últimos não constam da lista aprovada pelo Comitê de Peritos Europeus, que apresenta um número menor de compostos colorantes em comparação com a lista elaborada pela JECFA/WHO (TAYLOR, 1980).



Os corantes naturais (C.1) de origem vegetal podem ser subdivididos nos seguintes grupos: os derivados isoprenóides, como os carotenóides, os derivados tetrapirrólicos, como a clorofila, e os derivados benzopirenos, como as antocianinas, flavonóides e compostos afins.

Em 1982, a JECFA deliberou que deveriam ser avaliados toxicológica e genotoxicologicamente os corantes naturais que se enquadram nas seguintes situações: a) isolados de gênero alimentício sob forma química não modificada, mas utilizados em níveis que excedem os encontrados nos alimentos de origem ou em alimentos outros que não aqueles dos quais foram extraídos; b) isolados de alimentos mas modificados durante sua produção; c) não provenientes de fontes alimentícias.

Enquadram-se no primeiro grupo as betalaínas, pigmentos que ocorrem nas famílias Aizoaceae, Amaranthaceae, Chenopodiaceae, Didieraceae, Portulacaceae e Stegnospermaceae (PIATELLI, 1976), e que são compostos nitrogenados com quinze carbonos distribuídos nos vacúolos das células vegetais (MABRY & DREIDING, 1968).

Uma das espécies mais ricas em betalaínas é a beterraba (Beta vulgaris L.) que pertence à família Chenopodiaceae, ordem Centrospermae, e é uma olerícola de fácil cultivo, com um ciclo vegetativo de três a quatro meses. Estima-se que sua comercialização alcance no Brasil cerca de 26000 toneladas anuais (MOURA et alii, 1983). Por esse motivo, essa planta vem despertando particular interesse na indústria de alimentos.

As betalaínas embloam pigmentos vermelhos, as betacianinas, e pigmentos amarelos, as betaxantinas. Cerca de 75% a 95% do

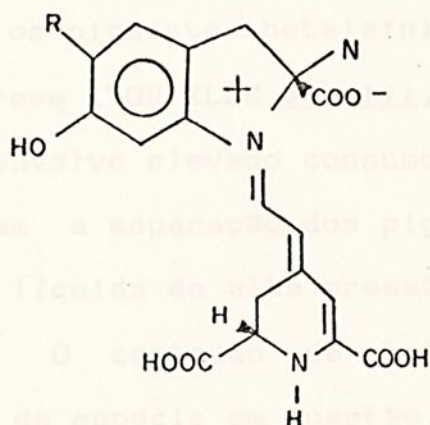


conteúdo total de betacianina da beterraba corresponde ao pigmento betanina (VON ELBE & MAING, 1973). A fração restante é composta de uma aglicona, a betanidina, e outro pigmento considerado como meio éster do ácido sulfúrico da betanina, a prebetanina, e dos sulfatos monoésteres isobetanina e isoprebetanina. As betaxantinas encontradas na beterraba são constituídas pela vulgaxantina I e a vulgaxantina II (Figura 3).

A biossíntese das betalainas se inicia a partir de duas moléculas de 3,4-dihidroxifenilalanina (DOPA). A abertura oxidativa do anel aromático e seu subsequente fechamento para um sistema dihidropiridínico produz o ácido betalânico, que origina a betanidina na condensação com ciclodopa. Esta derivaria de uma segunda molécula de DOPA, por ciclização oxidativa, presumivelmente por meio da dopaquinona, como postulado para os primeiros estádios de melanogênese. A reação do ácido betalânico com outros compostos amino ou imino ciclodopa produz as betalainas (PIATELLI, 1976).

As plantas podem absorver o nitrogênio, macronutriente essencial para o seu desenvolvimento, nas formas nítrica (NO_3) e a amoniacal (NH_4), sendo a primeira predominantemente utilizada pelas plantas superiores. Como nos compostos orgânicos o nitrogênio encontra-se em formas reduzidas, o nitrato (NO_3) deve ser transformado em amônia (NH_4) antes da incorporação em aminoácidos e proteínas. A beterraba, como algumas outras plantas, consegue absorver o nitrogênio pelas raízes tanto na forma amoniacal, em pH 7,0, incorporando-o diretamente, como na forma nítrica, em pH 5,0. A absorção desse macronutriente em quantidade acima da necessária faz com que ele seja armazenado sob a forma de nitrato (SALYSBURY & ROSS, 1969).

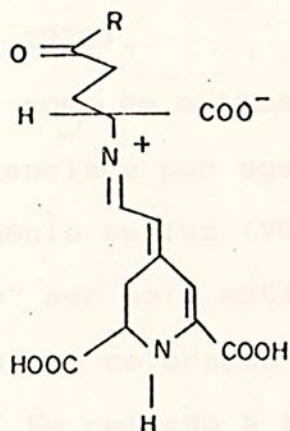




I - Betanina R = glicose

II - Betanidina R = OH

III - Prebetanina R = glicose - 6 - fosfato



IV - Vulgaxantina I R = NH₂

V - Vulgaxantina II R = OH

FIGURA 3 - Pigmentos betalânicos que ocorrem na beterraba .

(Beta vulgaris), segundo VON ELBE (1977).

A determinação quantitativa das betalaínas na beterraba é feita por técnicas espectrofotométricas (NIEUWHOF & DE BRUYN, 1972), podendo os pigmentos betalânicos ser individualmente separados por eletroforese (VON ELBE *et alii*, 1972). Como a separação por eletroforese envolve elevado consumo de tempo, ADAMS & VON ELBE (1977) propuseram a separação dos pigmentos betalânicos utilizando cromatografia líquida de alta pressão.

O conteúdo de betalaínas é influenciado pelo tipo de cultivar da espécie em questão, a época de colheita, as condições de cultivo e o tamanho das raízes, pois raízes pequenas e médias contêm uma quantidade significativamente maior de pigmentos do que raízes grandes (NILSSON 1973).

Assim como em outros pigmentos, a estabilidade das betalaínas é influenciada por agentes tais como pH, temperatura e a presença de oxigênio ou luz (VON ELBE *et alii*, 1974b). Desse modo, a betanina parece ser mais estável em pH entre 4,0 e 5,0, mas em muitos alimentos sua coloração não parece ser afetada em pH variando de 3,5 a 7,0. Em relação à temperatura, os valores de meia-vida desses pigmentos aumentam apreciavelmente quando a temperatura é diminuída. A exposição das betalaínas à radiação gama ou ultravioleta pode resultar em perda de cor (AURSTAD & DAHLE, 1973).

A sensibilidade das betalaínas a estes agentes provoca limitações na aplicação desses corantes. Os alimentos coloridos por esses pigmentos não devem receber um tratamento longo por calor durante o processamento, devem ser embalados para reduzir a exposição à luz, ao oxigênio e à umidade e devem ser preferencialmente alimentos secos. Apesar disso muitos autores demonstraram a impor-



tância de sua aplicação em diversos alimentos (VON ELBE & MAING, 1973; VON ELBE *et alii*, 1974a; PASCH *et alii*, 1975; PASCH & VON ELBE, 1977; VON ELBE, 1977b). Há referências de que seu uso como corante alimentar é antigo, pois no fim do século dezenove adicionava-se suco de caruru de cacho ao vinho a fim de obter uma cor vermelha mais apropriada, prática proibida e condenada mais tarde, por adulterar o vinho tinto (WYLER & DREIDING, 1961).

A quantidade do pigmento requerido para diferentes alimentos a fim de que seja obtida uma tonalidade desejada, para a maioria das aplicações, geralmente está em torno de 50 ppm de pó contendo betanina ou de 0,05% de corante em relação à massa do alimento. O poder de coloração conferido pelas betacianinas pode ser comparável ao FD & C Red no.2, cujo uso está suspenso pela FAO/WHO (VON ELBE, 1977b).

As betacianinas da beterraba se caracterizam pela presença de uma saponina tóxica denominada fitolacatoxina (APPLEBAUM & BIRK, 1979; LINDNER, 1984), caracterizada pela presença de uma aglicona policíclica ligada a uma cadeia carbônica (Figura 4). Não se tem conhecimento sobre a potencialidade mutagênica desse composto, mas sabe-se que muitas espécies animais não são capazes de se alimentar de plantas contendo saponinas, em decorrência da incapacidade metabólica para degradá-los (APPLEBAUM *et alii*, 1965; APPLEBAUM & GUEZ, 1972).

Em relação à avaliação do potencial mutagênico do corante da beterraba, tem-se referência apenas dos resultados publicados por ISHIDATE *et alii* (1984) que estudou a ação de vários aditivos alimentares sintéticos e naturais, pelo teste de Ames com e sem ativação metabólica e em culturas de fibroblastos de hamster chinês. O



corante da beterraba avaliado pelo teste de Ames mostrou-se mutagênico na concentração máxima de 75 mg/placa, o mesmo não tendo sido verificado nas culturas de fibroblastos. Contudo, esses dados são incompletos, pois não são fornecidas referências sobre a procedência, a forma e métodos de extração do corante, nem tampouco sobre a concentração de betanina do corante utilizado.

As betacianinas são estruturalmente relacionadas com os alcalóides e, por isso, são muitas vezes descritas como cromocalcalóides. Sua função fisiológica nas plantas é desconhecida, mas quando presentes em flores e frutos parecem ter um papel semelhante ao das antocianinas, na polinização e na dispersão das sementes pelos animais. As betalainas podem formar-se em tecidos injuriados, normalmente não pigmentados, possivelmente como mecanismos de defesa contra a infecção viral. Apesar da similaridade química, a atividade genotóxica reconhecida em muitos alcalóides não parece ser exercida pelos pigmentos vermelhos da beterraba.

A absorção, o metabolismo e a excreção da betanina extraída da beterraba foi estudada em ratos por KRANTZ *et alii* (1980). Quando ministrada por via oral, somente 3% da betanina era recuperada na urina e nas fezes, após 24 horas, e quantidade ainda menor foi encontrada na bili, em perfusões do fígado. Não se tem informações sobre a potencialidade mutagênica desses pigmentos *in vivo*, mas bioensaios de curta duração, efetuados por SCHWARTZ *et alii* (1983), não indicaram efeito de tratamentos com diferentes concentrações do corante da beterraba na iniciação ou promoção de hepatocarcinogênese em ratos.



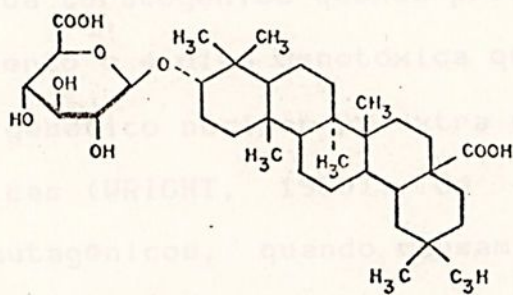


FIGURA 4 - Saponina da beterraba (Beta vulgaris)

4. Avaliação de toxicidade de componentes alimentares.

Um dos pontos importantes para a segurança alimentar é a qualidade dos testes utilizados para apontar os limites mínimos e máximos de ingestão de um determinado composto químico. Mesmo para o mais inócuo dos alimentos existe um limite acima do qual o risco será maior e para todas as substâncias tóxicas há um limite mínimo abaixo do qual o efeito tóxico não se manifestará (TAYLOR, 1980).

Uma substância é considerada tóxica quando causa a morte ou dano ou produz sintomas de intoxicação após ingestão aguda ou crônica; é considerada teratogênica quando produz anormalidades no embrião em desenvolvimento e é dita genotóxica quando induz efeitos tóxicos ao material genético nuclear ou extra nuclear de células germinativas e somáticas (WRIGHT, 1980). Os agentes genotóxicos podem ser designados mutagênicos, quando causam mutação em ponto ou pequenas alterações no material genético não detectáveis ao microscópio óptico ou alterações cromossômicas; como clastogênicos, quando induzem especificamente aberrações cromossômicas estruturais detectadas pela microscopia óptica; e como aneugênicos quando provocam aberrações numéricas por interferirem no funcionamento normal do aparelho mitótico. Um agente aneugênico pode também induzir efeitos citotóxicos modificando o funcionamento do aparelho mitótico ou deprimindo a síntese de macromoléculas essenciais à vida celular. Nesse caso, ele é especificamente denominado turbagênico (BRUSICK, 1984a).

A avaliação da genotoxicidade pode ser efetuada por meio de testes citogenéticos e não citogenéticos. Os testes não citogenéticos empregam organismos procariotos e eucariotos, ao contrário dos



citogenéticos cujos principais tipos celulares empregados são provenientes de organismos eucariotos. Ambos podem ser divididos em testes in vitro, e testes in vivo.

Os testes não citogenéticos in vitro, realizados em organismos procariotos, geralmente utilizam linhagens mutantes da bactéria *Salmonella typhimurium* (AMES, 1984b) ou cepas de *Escherichia coli* dependentes de triptofano (BRUSICK *et alii*, 1980). Os testes nos quais se empregam organismos eucariotos podem ser realizados com fungos, ou com células de vegetais superiores e de mamíferos (NATARAJAN & OBE, 1986).

Os testes não citogenéticos in vivo mais empregados são o dos locos específicos (RUSSEL, 1951), o das manchas em camundongos (RUSSEL & MAJOR, 1957) e o do hospedeiro intermediário (EPSTEIN & ROHRBORN, 1971; LEGATOR, 1976).

A análise citogenética in vitro pode ser realizada com qualquer linhagem que tenha capacidade de crescer em condições apropriadas de cultura e possibilite a investigação em diferentes fases do ciclo celular e o uso dos sistemas de ativação metabólica requeridos para compostos que são mutagênicos proximais ou secundários (BRUSICK, 1984b).

Os testes citogenéticos in vivo são realizados em um organismo animal intacto e por isso oferecem vantagens sobre os outros, pois o composto a ser testado é submetido às reações bioquímicas que podem tanto ativá-lo como inativá-lo. Além do mais, as vias de administração e as condições de exposição ao composto podem assemelhar-se às do homem.

As células de medula óssea de animais de pequeno porte e



de ciclo reprodutivo curto, como camundongo, rato, hamster e outros, pelo seu alto poder proliferativo, favorecem amplamente a avaliação in vivo da atividade citotóxica, clastogênica e aneugênica de compostos. Estes podem ser administrados pelas vias oral, intradérmica, intraperitoneal, por inalação ou por exposição dérmica. Após um período de tempo apropriado, os animais são sacrificados, os fêmures são retirados e a medula é colhida para, em seguida, proceder-se às preparações das lâminas. Por meio dessa técnica pode-se detectar se o composto em questão é capaz de interferir na cinética de divisão celular e induzir aberrações estruturais ou numéricas e trocas entre cromátides-irmãs (TICE & IVETT, 1985).

A indução de aberrações cromossômicas também pode ser avaliada pelo teste de micronúcleos em células de medula óssea. Os micronúcleos resultam de fragmentos acêntricos ou cromossomos que se atrasam em sua migração para os polos e não são incluídos no núcleo-filho. Na medula óssea, os micronúcleos formados são retidos no citoplasma, em contraste com o núcleo principal que é expelido quando o eritroblasto se transforma em eritrócito (HEDDLE, 1973). Esse teste é amplamente utilizado pela facilidade com que os micronúcleos são reconhecidos. Para efetuá-lo, os animais são expostos à substância-teste por via apropriada. Após o sacrifício dos animais, retira-se a medula óssea e preparam-se os esfregaços que são corados e observados ao microscópio.

Os estudos in vivo também podem ser desenvolvidos em indivíduos expostos acidental, ocupacional ou terapeuticamente. Nesses casos, as alterações podem ser pesquisadas em linfócitos do sangue periférico, em células de medula óssea ou preparação de testículos. No primeiro caso, após a coleta do material procede-se



OBJETIVOS

a cultura de células, sendo analisados o índice mitótico e as frequências de eventos clastogênicos e aneugênicos e de trocas entre cromátides-irmãs. As preparações de testículos são efetuadas em animais tratados apropriadamente e o exame citogenético é efetuado em espermatogônias e espermatócitos.



OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivo investigar o potencial mutagênico do corante da beterraba (Beta vulgaris), pela ocorrência de efeitos cicloativos e clastogênicos em sistemas in vivo, analisados por meio de testes citogenéticos.

Sua proposição baseou-se nas conclusões do Comitê Misto FAO/WHO de Peritos em Aditivos para Alimentos (JECFA, 1982), que reconheceu nesse corante um possível substituto de corantes sintéticos que foram proibidos, mas destacou a necessidade de sua avaliação de forma mais completa por metodologia científica, a fim de que possa ser estabelecida a dose de ingestão diária aceitável.



II. MATERIAL E METODOS

No presente estudo foram testadas duas frações do corante da beterraba; a fração I sem nitratos, mas contendo fibras e a fração II sem fibras, porém com nitratos ambas cedidas pela Dra. Seiva Cascon, do Centro de Tecnologia Agrícola e Alimentar da Empresa Brasileira de Pesquisas Agropecuárias (CTAA-EMBRAPA) de Guaratiba, Rio de Janeiro.

A fração I foi preparada através da moagem do produto laminado e seco em estufa, a temperatura de 45 C. Desse pó, separou-se a betacianina, que é mais instável, por extração em álcool absoluto. A betacianina foi, a seguir, extraída com etanol-ácido clorídrico 1% V/V, em coluna tipo percolador (MOURA *et alii*, 1983). O teor de betacianina foi determinado em espectrofotômetro BECKMAN DBG, com base na absorção máxima A (cerca de 537 nm), encontrando-se 434,0 mg de betacianina para 100 g de pó do corante.

A fração II foi preparada pelo laboratório francês Chr. Dansen A/S, e segundo informações do Dr. José Eduardo Guiraldini, da Indústria HA-LA do Brasil, filiada àquele laboratório, possui um teor de 10 a 15 ppm de nitratos e não apresenta fibras. O teor de betanina foi determinado como sendo 647,3 mg de betanina em 100 g de pó do corante. As frações foram acrescidas de ácido ascórbico durante seu preparo, a fim de garantir maior estabilidade durante a conservação e uso.

A avaliação *in vivo* da mutagenicidade das frações I e II foi feita em preparações de medula óssea de Rattus norvegicus var. Wistar, com 6 a 7 semanas de idade, tratados por via oral durante sete dias consecutivos.



Foram realizados quatro ensaios. Os ensaios I e II equivalem ao tratamento com a fração I (sem nitratos), correspondendo, respectivamente, às concentrações de 5 mg de pó ou 0,02 mg de betanina para 100 g de peso corpóreo (pc) e 1160 mg de pó ou 5 mg de betanina para 100 g de pc. Os ensaios III e IV referem-se aos tratamentos com a fração II (com nitratos), nas respectivas doses de 3,3 mg de pó ou 0,02 mg de betanina para 100 g de pc e 770 mg de pó ou 5 mg de betanina para 100 g de pc. Cada ensaio compõe-se de experimentos, realizados em épocas diferentes, e que são constituídos por grupos tratados e controles.

O corante foi diluído em cerca de 15 ml de água e oferecido aos animais diariamente por volta das 18 horas, em bebedouros de vidro fixados nas gaiolas. Durante o período noturno só lhes era oferecido a solução do corante.

A primeira concentração (0,02 mg/100 g pc) foi escolhida por equivaler a cerca da metade do valor numérico da IDA do corante sintético vermelho amaranço, que é de 0,2 mg/Kg pc. A segunda concentração (5 mg/100 g pc) equivale a um tratamento agudo em que o animal ingere durante uma semana o que ingeriria durante toda sua vida, considerando-se dois anos como o tempo de vida médio desses animais. Neste tratamento, tomou-se por base a IDA máxima do corante amaranço, que é de 0,5 mg/Kg pc.

Foi feita a equivalência da concentração de betanina entre as frações I e II. Desse modo, para ministrar 0,02 mg de betanina utilizaram-se 5 mg da fração I (sem nitratos), contendo 434,0 mg de betanina/100 g de pó, e 3,3 mg da fração II (com nitratos), contendo 647,3 mg de betanina/100 g de pó. Do mesmo modo,



para ministrar 5 mg de betanina, utilizaram-se 1160 mg da fração I e 770 mg da fração II.

Os grupos controles constituíram-se do controle negativo, em que os animais não recebiam qualquer tratamento, e do controle positivo, em que os animais receberam, 24 horas antes do sacrifício, tratamento com solução de ciclofosfamida, um composto sabidamente mutagênico, na dose de 5 mg para cada 100 g de peso corpóreo, por via intraperitoneal.

No oitavo dia, os animais foram sacrificados e tiveram seus fêmures removidos, tendo recebido, 75 minutos antes do sacrifício, injeção via intraperitoneal de colquicina a 0,016% na dose de 0,4 ml para cada 100 g de peso corpóreo. Parte do material foi destinada à pesquisa de micronúcleos em eritrócitos poli e normocromáticos e a outra para a pesquisa de aberrações cromossômicas; como nem sempre foi possível analisar em um mesmo espécime os parâmetros de micronúcleos e aberrações cromossômicas, os números de identificação não correspondem a um mesmo animal.

1. Preparações de micronúcleos

A medula óssea foi colhida com auxílio de uma seringa de 1 ml, em tubo de ensaio contendo 5 ml de soro fetal bovino. Fez-se a homogeneização do material e centrifugou-se por 5 a 10 minutos a 1000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, homogeneizou-se o botão de células e fez-se um esfregaço, transferindo uma gota dessa suspensão celular para uma lâmina seca e sem gordura.

Após 24 horas, as lâminas foram aquecidas a 37°C por cerca de 2 horas, flambadas à chama de lamparina de álcool e coradas



primeiramente em solução de Wright por 3 minutos, em seguida por um minuto em solução de Wright-tampão fosfato pH 6,0 (1:1). Lavou-se duas vezes em água desionizada e procedeu-se à coloração em solução de Giemsa 4%, tampão fosfato pH 6,0 e água desionizada, por 10 minutos. Lavou-se novamente em água desionizada e montou-se em Permunt.

A frequência de micronúcleos foi observada sob objetiva de 100 x, contando-se o número de micronúcleos em 2000 eritrócitos poli (azuis) ou normocromáticos (rosas).

Os efeitos da fração I do corante foram pesquisados em 8 indivíduos (4 machos e 4 fêmeas) tratados na concentração de 0,02 mg de betanina/100 g de pc e 7 indivíduos (3 machos e 4 fêmeas) na concentração de 5 mg de betanina/100 g de pc. Os efeitos da fração II do corante foram estudados em 8 indivíduos (4 machos e 4 fêmeas), nas duas concentrações.

2. Preparação de medula óssea

Retirou-se a medula óssea com o auxílio de uma seringa de 1 ml, em tubo de ensaio contendo 5 ml de solução balanceada de Hanks. Homogeneizou-se o material e centrifugou-se por cinco minutos a 1000 rpm. As células foram, a seguir, hipotonizadas com solução de KCl a 0,075 M por 20 minutos a 37 °C. Após esse tempo, tal procedimento foi interrompido com a adição de três gotas de fixador metanol - ácido acético (3:1). Centrifugou-se por cinco minutos a 1000 rpm e fixou-se as células, com três trocas consecutivas de fixador. Cinco a seis gotas da suspensão celular foram pingadas em lâminas contendo um filme de água gelada. Em seguida, a lâmina foi flambada à chama



de lamparina de álcool e corada com a solução de Giemsa a 2% durante cinco minutos.

As alterações cromossômicas (AC) estruturais e numéricas foram pesquisadas em 100 metáfases de cada animal tendo sido também registrados o índice mitótico (IM) e o índice mitótico relativo (IMR).

Considerou-se uma alteração cromossômica estrutural como quebra quando a descontinuidade era maior que a largura da própria cromátide, com deslocamento do segmento acêntrico. Quando o segmento permanecia em alinhamento e a descontinuidade não excedia a largura da própria cromátide, considerou-se a anomalia como falha. Esses eventos foram classificados como cromatídico quando afetavam uma só cromátide, cromossômicos quando afetavam ambas e centromérico quando envolviam o centrômero. As anomalias numéricas pesquisadas foram hiperdiploidia (aumento do número cromossômico) e hipodiploidia (diminuição no número cromossômico). Considerou-se o índice mitótico como a frequência de células em divisão em 2000 núcleos e o índice mitótico relativo como a proporção percentual do índice mitótico de cada amostra tratada em relação ao seu controle.

Foram submetidos ao tratamento com a fração I na concentração de 0,02 mg de betanina/100 pc 8 espécimes (5 machos e 3 fêmeas) e na concentração de 5 mg de betanina/100 pc 4 espécimes (2 machos e 2 fêmeas). Ao tratamento com a fração II foram submetidos 7 espécimes (3 machos e 4 fêmeas) à primeira concentração e 4 espécimes (2 machos e 2 fêmeas) à segunda concentração.

Os experimentos realizados, com o tipo de tratamento em cada ensaio, a dose empregada e o número de animais tratados e



controles negativos estudados para cada parametro estão resumidos a seguir.

Resumo dos experimentos realizados.

Ensaio	Fração	Dose (mg/100 g pc)	No. de animais	Parametros analisados		
				Micronúcleos	IM	AC
I	I	0,02	8	X		
		0,02	8		X	
		0,02	8			X
	-	--	3	X		
	-	--	6		X	X
II	I	5,0	7	X		
		5,0	4		X	
		5,0	4			X
	-	--	4	X		
	-	--	2		X	X
III	II	0,02	8	X		
		0,02	8		X	
		0,02	8			X
	-	--	6	X		
	-	--	4		X	
IV	II	5,0	5			X
		5,0	8	X		
		5,0	4		X	
	-	--	4	X		X
	-	--	2		X	X

Fração I: sem nitratos, com fibras

IM: Índice mitótico

Fração II: com nitratos, sem fibras

AC: Anomalias cromossômicas



Para a análise estatística dos dados deste trabalho foram empregados o teste Z para comparação das amostras de cada grupo analisadas em períodos diferentes (cf. NETER & WASSERMAN, 1974), a estatística G para comparação de distribuição de frequências (SOKAL & ROHLF, 1969) e o teste t de Student para significância de diferenças entre as médias (cf. SCHEFLER, 1969).



III. RESULTADOS

1. Micronúcleos

As frequências de micronúcleos encontradas nas amostras tratadas com a fração I do corante nas doses de 0,02 (Ensaio I) e 5,0 mg (Ensaio II) de betanina por 100 g de pc por dia estão apresentadas na Tabela 1, e as encontradas nas amostras tratadas com a fração II do corante, nas mesmas concentrações (Ensaio III e IV) estão na Tabela 2. Cada um dos ensaios foi desenvolvido em diversas etapas, daí existirem controles específicos para certas amostras.

As várias amostras de cada grupo (tratados, controles negativos e controles positivos) analisadas em períodos diferentes foram comparadas pelo teste Z, não tendo sido detectada variação significativa intragrupal nos ensaios I, II e IV, o mesmo não ocorrendo com as amostras do ensaio III, que para melhor identificação foram designadas IIIa, IIIb e IIIc. As amostras tratadas na segunda etapa (IIIb) diferiram das demais, o mesmo ocorrendo com os controles negativos da terceira etapa (IIIc).

Os resultados das diversas amostras de cada grupo que não apresentavam variação significativa foram somados e apresentados na Tabela 3, como os valores médios e o desvio-padrão das frequências de micronúcleos. Os valores do teste t para comparação das frequências de micronúcleos entre as diferentes amostras de cada ensaio e entre os grupos dos diferentes ensaios encontram-se na Tabela 4. Conclui-se que as amostras do grupo exposto às duas concentrações das frações I (sem nitratos) e II (com nitratos) do corante não diferem dos controles



negativos mas ambas diferem dos controles positivos que apresentaram frequências de micronúcleos significativamente maiores. Quando comparou-se os diferentes ensaios detectou-se diferença significativa entre as duas doses da fração I do corante, sendo que a frequência de micronúcleos esteve relacionada à dose do corante. Não foram observadas diferenças entre os tratamentos com as frações I e II na dose de 5 mg de betanina (Ensaio II e IV) nem entre os controles negativos ou positivos dos diferentes ensaios. As comparações entre os tratamentos com as frações I e II na dose 0,02 mg de betanina não puderam ser efetuadas, em virtude da variabilidade interindividual verificada, no Ensaio III.

A Figura 5 apresenta fotomicrografia de eritrócito contendo micronúcleo.

Tabela 1. Frequências absoluta (FA) e relativa (FR) de micronúcleos em 2000 células de medula óssea de *Rattus norvegicus* tratados com a fração I nas concentrações de 0,02 mg (Ensaio I) e 5,0 mg (Ensaio II) de betanina/100g pc.

Ensaio	Amostra	Sexo	Micronúcleos	
			FA	FR
I	AT1	M	36	1,8
	AT2	M	28	1,4
	AT3	F	28	1,4
	AT4	F	26	1,3
	AT5	F	24	1,2
	AT6	F	28	1,4
	ACN1	M	24	1,2
	ACN2	F	24	1,2
	ACP1	F	52	2,6
	AT7	M	36	1,8
	AT8	M	36	1,8
	ACN3	M	46	2,3
	ACP2	M	72	3,6
II	AT1	M	34	1,7
	AT2	F	44	2,2
	AT3	F	34	1,7
	ACN1	M	38	1,9
	ACN2	F	34	1,7
	ACP1	M	68	3,4
	AT4	M	46	2,3
	AT5	M	52	2,6
	AT6	F	40	2,0
	AT7	F	40	2,0
	ACN3	M	46	2,3
	ACN4	F	46	2,3
	ACP2	M	72	3,6

AT : animal tratado

M: macho

ACN: animal controle negativo

F: fêmea

ACP: animal controle positivo



Tabela 2. Frequências absoluta (FA) e relativa (FR) de micronúcleos em 2000 células de medula óssea de Rattus norvegicus tratados com a fração II nas concentrações de 0,02 mg (Ensaio III) e 5 mg (Ensaio IV) de betanina/100g pc

Ensaio	Amostra	Sexo	Micronúcleos	
			FA	FR
III	IIIa	AT1	42	2,1
		AT2	40	2,0
		AT3	42	2,1
		ACN1	28	1,4
		ACN2	36	1,8
		ACP1	72	3,6
	IIIb	AT4	24	1,2
		AT5	22	1,1
		AT6	24	1,2
		ACN3	24	1,2
		ACN4	24	1,2
		ACP2	52	2,6
	IIIc	AT7	38	1,9
		AT8	40	2,0
		ACN5	46	2,3
		ACN6	46	2,3
		ACP3	72	3,6
IV		AT1	36	1,8
		AT2	46	2,3
		AT3	38	1,9
		AT4	46	2,3
		ACN1	32	1,6
		ACN2	34	1,7
		ACP1	70	3,5
		AT5	50	2,5
		AT6	42	2,1
		AT7	52	2,6
		AT8	60	3,0
		ACN3	46	2,3
		ACN4	46	2,3
		ACP2	72	3,6

AT : animal tratado
 ACN: animal controle negativo
 ACP: animal controle positivo

M: macho
 F: fêmea



Tabela 3. Média e desvio-padrão das frequências de micronúcleos agrupando-se as amostras de mesmo tratamento em cada ensaio.

Ensaio	Fração	Betanina (mg/100 g pc)	Grupo	N	$\bar{X}$	+ -	s
I	I	0,02	AT	8	30,2		5,0
			ACN	2	24,0		0,0
			ACP	2	62,0		14,1
II	I	5,00	AT	7	41,4		6,4
			ACN	4	41,0		6,0
			ACP	2	70,0		2,8
III	II	0,02	AT(1,2,3,7,8)	5	40,4		1,6
			AT(4,5,6)	3	23,3		1,1
			ACN(1,2,3,4)	4	28,0		5,6
			ACN(5,6)	2	46,0		0,0
			ACP(1,2,3)	3	62,0		12,2
IV	II	5,00	AT	8	46,2		7,8
			ACN	4	39,5		7,5
			ACP	2	71,0		1,4

AT : animal tratado

M: macho

ACN: animal controle negativo

F: fêmea

ACP: animal controle positivo

Fração I : sem nitratos

Fração II: com nitratos



Tabela 4. Valores de t para comparação das médias das frequências de micronúcleos entre as diferentes amostras de mesmo tratamento em cada ensaio e entre as de diferentes ensaios. ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$.

Ensaio	Grupos	t	Gl	tc 5%	Significância
I	AT x ACN	1,69	8	1,89	ns
	AT x ACP	5,90	8	1,89	*
	ACN x ACP	2,60	3	2,35	*
II	AT x ACN	0,10	9	1,83	ns
	AT x ACP	5,83	7	1,89	*
	ACN x ACP	6,21	4	2,13	*
III	AT 1,2,3 x ACN 1,2	2,28	2	2,92	ns
	AT 4,5,6 x ACN 3,4	0,82	3	2,35	ns
	AT 7,8 x ACN 5,6	6,00	1	6,31	ns
	AT 1,2,3,7,8 x ACP 1,2,3	3,20	6	1,94	*
	AT 4,5,6 x ACP 1,2,3	5,44	4	2,13	*
	ACN 1,2,5,6 x ACP 1,2,3	3,16	5	2,01	*
	ACN 3,4 x ACP 1,2,3	4,16	3	3,18	*
IV	AT x ACN	1,41	10	1,81	ns
	AT x ACP	4,28	9	1,83	*
	ACN x ACP	5,53	4	2,13	*
Diferen- tes en- saio	AT(I) x AT(II)	3,50	13	1,77	*
	AT(II) x AT(IV)	1,19	13	1,77	ns
	ACN(II) x ACN(IV)	0,38	6	1,94	ns
	ACP(II) x ACP(IV)	0,31	2	2,92	ns

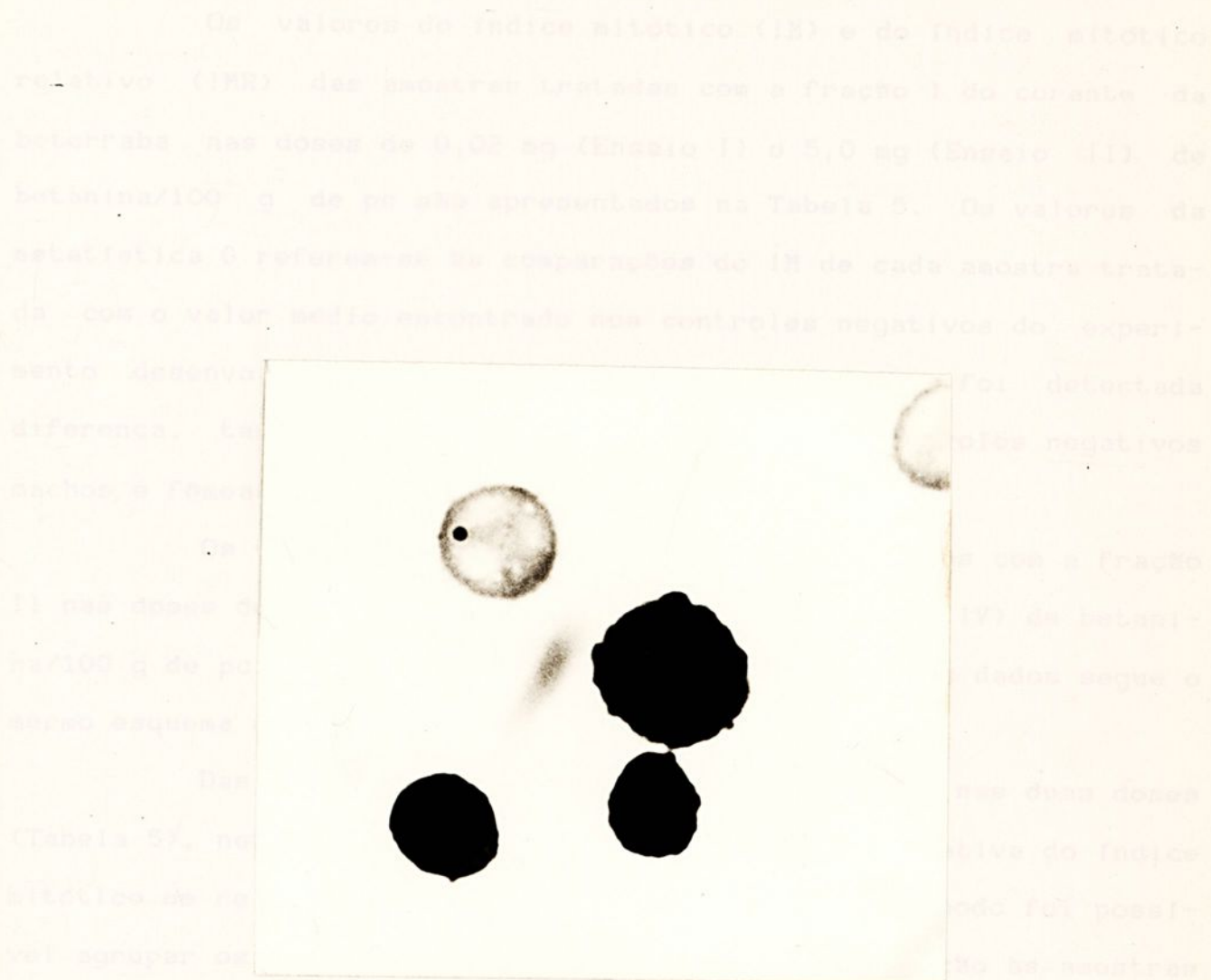


Figura 5. Eritrócito com micronúcleo.

2. Índice Mitótico

Os valores do índice mitótico (IM) e do índice mitótico relativo (IMR) das amostras tratadas com a fração I do corante da beterraba nas doses de 0,02 mg (Ensaio I) e 5,0 mg (Ensaio II) de betanina/100 g de pc são apresentados na Tabela 5. Os valores da estatística G referem-se às comparações do IM de cada amostra tratada com o valor médio encontrado nos controles negativos do experimento desenvolvido na mesma etapa, uma vez que não foi detectada diferença, também pela estatística G, entre os controles negativos machos e fêmeas.

Os valores de IM e IMR das amostras tratadas com a fração II nas doses de 0,02 mg (Ensaio III) e 5,0 mg (Ensaio IV) de betanina/100 g de pc constam da Tabela 6. A apresentação dos dados segue o mesmo esquema descrito para a fração I.

Das oito amostras tratadas com a fração I nas duas doses (Tabela 5), nenhuma delas apresentou redução significativa do índice mitótico em relação ao seu controle negativo, desse modo foi possível agrupar os dados, conforme a Tabela 7. Com relação às amostras tratadas com a fração II (Tabela 6), apenas um animal apresentou redução significativa do IM em relação ao seu controle negativo, o mesmo não ocorrendo com as outras amostras, que puderam ser agrupadas, considerando-se as duas doses do corante (Tabela 7). Foram também agrupados nesta tabela os índices mitóticos de todos os controles positivos que foram iguais (1,0).

Os valores da estatística G para as comparações entre as amostras tratadas com as duas doses das frações I e II do corante da beterraba e seus respectivos controles negativos e positivos constam



da Tabela 8. Não foram detectadas diferenças significativas nos valores do IM entre as amostras tratadas e os controles negativos, mas sim quando ambos foram comparados com os controles positivos.

Ensaio	Amostra	Sexo	IM (X)	IM (Y)	G	Significância
	A71	M	4,5	89,2	0,00	ns
	A72	F	5,2	100,0	0,53	ns
	ACH3,2	M.F	6,5	100,0		
	A73	M	7,5	91,4	0,97	ns
	A74	M	3,0	60,0	2,33	ns
	A75	F	5,0	60,9	1,01	ns
	ACH3,4	M.F	8,2	100,0	0,27	ns
	A76	M	5,5	130,9	0,30	ns
	A77	M	2,0	47,5	2,34	ns
	A78	F	3,5	83,3	0,53	ns
	ACH5,6	M.F	4,2	100,0	0,33	ns
II	A71	M	3,0	85,7	0,07	ns
	A72	M	4,5	128,6	0,53	ns
	A73	F	6,5	130,0	0,35	ns
	A74	F	4,0	60,0	0,32	ns
	ACH1,2	M.F	4,2	100,0	0,53	ns



Tabela 5. Valores da estatística G para comparação das frequências do índice mitótico (IM) e índice mitótico relativo (IMR) em 2000 células de medula óssea de *Rattus norvegicus* tratados com a fração I nas doses de 0,02 mg (Ensaio I) e 5,0 mg (Ensaio II) de betanina/100 g pc e seus respectivos controles. ns = $P > 0,05$.

Ensaio	Amostra	Sexo	IM (%)	IMR (%)	G	Significância
I	AT1	M	4,5	69,2	0,00	ns
	AT2	F	6,5	100,0	0,53	ns
	ACN1,2	M,F	6,5	100,0	0,00	ns
	AT3	M	7,5	91,4	0,27	ns
	AT4	M	5,0	60,9	2,33	ns
	AT5	F	5,0	60,9	1,01	ns
	ACN3,4	M,F	8,2	100,0	0,27	ns
	AT6	M	5,5	130,9	0,90	ns
	AT7	M	2,0	47,6	2,94	ns
	AT8	F	3,5	83,3	0,53	ns
II	ACN5,6	M,F	4,2	100,0	0,53	ns
	AT1	M	3,0	85,7	0,07	ns
	AT2	M	4,5	128,6	0,53	ns
	AT3	F	6,5	130,0	0,39	ns
	AT4	F	4,0	80,0	0,22	ns
	ACN1,2	M,F	4,2	100,0	0,53	ns

AT : animal tratado

M: macho

ACN: animal controle negativo

F: fêmea



Tabela 6. Valores da estatística G para comparação das frequências do índice mitótico (IM) e índice mitótico relativo (IMR) em 2000 células de medula óssea de Rattus norvegicus tratados com a fração II nas doses de 0,02 mg (Ensaio III) e 5,0 mg (Ensaio IV) de betanina/100 g pc e seus respectivos controles. ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$.

Ensaio	Amostra	Sexo	IM (%)	IMR (%)	G	Significância
III	AT1	M	4,0	76,9	0,00	ns
	AT2	F	6,5	125,0	0,00	ns
	AT3	F	4,0	76,9	1,20	ns
	ACN1,2	M,F	5,2	100,0		
	AT4	M	4,0	44,4	3,90	*
	AT5	M	6,0	66,6	1,20	ns
	ACN3	M	9,0	100,0		
	AT6	F	2,5	50,0	1,70	ns
	AT7	F	2,5	50,0	1,70	ns
	ACN4	F	5,0	100,0		
IV	AT1	M	4,0	59,7	3,30	ns
	AT2	M	4,5	67,1	2,50	ns
	AT3	F	6,5	97,0	0,40	ns
	AT4	F	3,5	52,2	0,50	ns
	ACN1,2	M,F	6,7	100,0	1,80	ns

AT : animal tratado

ACN: animal controle negativo

M: macho

F: fêmea

Tabela 7. Valores médios do índice mitótico (IM) e índice mitótico relativo (IMR) dos grupos tratados com as frações I e II, nas concentrações de 0,02 mg (Ensaio I e III) e 5,0 mg (Ensaio II e IV) de betanina/100 g pc, dos controles negativos e positivos.

Ensaio	Fração	Grupo	IM	IMR
I	I	AT	4,9	78,0
		ACN	6,3	100,0
		ACP	1,0	15,6
II	I	AT	4,5	107,1
		ACN	4,2	100,0
		ACP	1,0	23,8
III	II	AT	4,2	87,5
		ACN	6,1	100,0
		ACP	1,0	20,8
IV	II	AT	4,6	67,6
		ACN	6,8	100,0
		ACP	1,0	14,9

AT : animal tratado

ACN: animal controle negativo

ACP: animal controle positivo



Tabela 8. Valores da estatística G (1 grau de liberdade) para comparação entre os índices mitóticos dos grupos tratados com as frações I e II nas concentrações de 0,02 mg (Ensaio I e III) e 5,0 mg (Ensaio II e IV) de betanina/100 g pc e os respectivos controles negativos e positivos e entre os controles. ns = $P > 0,05$; * = $P < 0,05$.

Ensaio	Fração	Grupos	G	Significância
I	I	AT x ACN	1,93	ns
		AT x ACP	10,51	*
		ACN x ACP	15,22	*
II	I	AT x ACN	0,02	ns
		AT x ACP	6,86	*
		ACN x ACP	5,39	*
III	II	AT x ACN	3,30	ns
		AT x ACP	6,60	*
		ACN x ACP	11,40	*
IV	II	AT x ACN	2,20	ns
		AT x ACP	7,20	*
		ACN x ACP	11,77	*

AT : animal tratado

ACN: animal controle negativo

ACP: animal controle positivo



3. Anomalias Cromossômicas

As tabelas 9 e 10 apresentam as porcentagens de metáfases com anomalias estruturais, bem como as médias das frequências de anomalias estruturais por metáfase anômala, respectivamente nas amostras tratadas com as frações I (Ensaio I e II) e II (Ensaio III e IV) do corante e nos controles positivo e negativo.

As várias amostras de cada grupo (tratados, controles negativos e controles positivos) foram comparadas pelo teste Z que mostrou não haver diferença significativa intragrupal, desse modo, os dados puderam ser agrupados conforme mostra a Tabela 11. Os valores do teste t para comparação das frequências de aberrações cromossômicas estruturais (ACE) entre as amostras tratadas e os controles negativos e positivos e entre os controles são apresentados na Tabela 12, podendo-se observar que não houve diferença significativa entre as amostras tratadas e os controles negativos, mas ambos diferiram dos controles positivos.

As distribuições dos diferentes tipos de aberrações são apresentadas nas Tabelas 13 (Ensaio I e II) e 14 (Ensaio III e IV) e na Tabela 15 os totais de ACE nas amostras tratadas, controles negativos e positivos nos quatro ensaios. Para o Ensaio I, verifica-se nas amostras tratadas que as falhas cromatídicas foram os eventos mais frequentes, seguidos de proporções semelhantes de quebras cromatídicas e cromossômicas e de menor proporção de falhas cromossômicas. As distribuições de quebras e falhas, independentemente de serem cromatídicas ou cromossômicas foram similares; já a distribuição dos eventos do tipo cromatídico e cromossômico, independente-



mente de terem sido gerados por falhas ou quebras, apresentou maior proporção do primeiro tipo. Para as amostras do controle negativo, as quebras e falhas, tanto do tipo cromatídico como cromossômico, ocorreram em proporções similares.

Para o Ensaio II verificou-se nas amostras tratadas que, dos eventos anômalos ocorridos, as quebras cromatídicas foram os tipos mais freqüentes, seguidos pelas quebras cromossômicas e falhas cromatídicas que ocorreram em proporções similares. O grupo controle negativo só apresentou eventos anômalos do tipo quebra, sendo as cromatídicas mais freqüentes que as cromossômicas.

Nas amostras tratadas do Ensaio III, observou-se que as falhas e quebras cromatídicas foram os eventos anômalos mais freqüentes, ao contrário das falhas e quebras cromossômicas que ocorreram em proporções bem menores. A proporção de quebras e falhas foi a mesma, independente de ser do tipo cromatídico ou cromossômico, mas o tipo cromatídico foi mais freqüente que o cromossômico, independente de pertencer à categoria de quebra ou falha.

Entre os eventos anômalos observados para o controle negativo, a proporção de quebras foi maior do que a de falhas, independente de terem sido do tipo cromatídico ou cromossômico; todavia, a proporção de aberrações do tipo cromatídico foi maior do que as do tipo cromossômico, independente de terem sido geradas por quebras ou falhas.

No ensaio IV, não ocorreram aberrações do tipo cromossômico e as quebras cromatídicas ocorreram em proporções superiores às das falhas cromatídicas nas amostras tratadas. No controle negativo, as quebras cromatídicas foram os eventos mais freqüentes; seguidos de proporções similares de quebras cromossômicas e falhas cromatídi-



cas. Os controles apresentaram nos quatro ensaios, proporções maiores de quebras em relação a falhas, sendo que os tipos cromatídico e cromossômico ocorreram em proporções semelhantes, tanto em relação a quebras como a falhas. Os eventos anômalos registrados no tipo "outros" foram figuras tri e quadrirradiais e só foram observados nessas amostras. Não se detectou a ocorrência de anomalias cromossômicas numéricas.

Na figura 6 são apresentadas fotomicrografias de metáfase sem anomalias e metáfases parciais com anomalias do tipo falha cromatídica e quebra cromossômica.

46/963

ACH2	F	100	1	1.0	0.0
AT3	H	100	7	1.3	0.3
AT4	H	100	5	1.2	0.4
AT5	F	100	5	1.0	0.0
ACH3	F	50	1	1.0	0.0
ACH4	F	50	1	1.0	0.0
AT6	H	100	4	1.0	0.0
AT7	H	100	2	1.0	0.0
AT8	F	100	4	1.2	0.3
ACH5	H	100	2	1.0	0.0
ACH6	F	100	3	1.0	0.0
ACP		50	26	2.3	2.1
AT1	H	100	2	1.0	0.0
AT2	H	100	2	1.0	0.0
AT3	F	100	3	1.0	0.0
AT4	F	50	1	1.0	0.0
ACH1	H	100	2	1.0	0.0
ACH2	F	100	3	1.0	0.0
ACP		10	7	2.0	2.2

AT: animal tratado H: macho
 ACH: animal controle negativo F: fêmea
 ACP: animal controle positivo



Tabela 9. Frequências de aberrações cromossômicas estruturais (ACE) em células de medula óssea de Rattus norvegicus tratados com a fração I nas concentrações de 0,02 mg (Ensaio I) e 5,0 mg (Ensaio II) de betanina/100 g pc.

Ensaio	Amostra	Sexo	No. de metáfases	% metáfases anômalas	ACE		
					$\bar{X}$	+	s
I	AT1	M	100	4	1,2		0,5
	AT2	F	100	2	1,0		0,0
	ACN1	M	50	2	1,0		0,0
	ACN2	F	100	4	1,0		0,0
	AT3	M	100	7	1,1		0,3
	AT4	M	100	5	1,2		0,4
	AT5	F	100	5	1,0		0,0
	ACN3	M	50	6	1,0		0,0
	ACN4	F	50	4	1,0		0,0
	AT6	M	100	4	1,0		0,0
	AT7	M	100	2	1,0		0,0
	AT8	F	100	4	1,2		0,5
	ACN5	M	100	2	1,0		0,0
	ACN6	F	100	3	1,0		0,0
	ACP		50	26	2,3		2,1
II	AT1	M	100	2	1,0		0,0
	AT2	M	100	2	1,0		0,0
	AT3	F	100	3	1,0		0,0
	AT4	F	50	1	1,0		0,0
	ACN1	M	100	2	1,0		0,0
	ACN2	F	100	3	1,0		0,0
	ACP		10	7	2,0		2,2

AT : animal tratado

M: macho

ACN: animal controle negativo

F: fêmea

ACP: animal controle positivo



Tabela 10. Frequências de aberrações cromossômicas estruturais (ACE) em células de medula óssea de *Rattus norvegicus* tratados com a fração II nas concentrações de 0,02 mg (Ensaio III) e 5,0 mg (Ensaio IV) de betanina/100 g pc.

Ensaio	Amostra	Sexo	No. de metáfases	% metáfases anômalas	ACE		
					$\bar{X}$	+	s
III	AT1	M	100	3	1,0		0,0
	AT2	F	100	6	1,0		0,0
	AT3	F	100	3	1,0		0,0
	ACN1	M	50	0	1,0		0,0
	ACN2	F	100	2	1,5		0,5
	AT4	M	100	3	1,0		0,0
	AT5	M	100	6	1,0		0,0
	AT6	F	100	3	1,0		0,0
	ACN3	M	50	6	1,0		0,0
	ACN4	F	50	4	1,0		0,0
	AT7	F	100	4	1,0		0,0
	ACN5	F	100	3	1,0		0,0
	ACP		50	26	2,3		2,1
IV	AT1	M	100	1	1,0		0,0
	AT2	M	100	1	1,0		0,0
	AT3	F	100	4	1,0		0,0
	AT4	F	100	3	1,3		0,6
	ACN1	M	100	2	1,0		0,0
	ACN2	F	100	3	1,0		0,0
	ACP		10	7	2,0		2,0

AT : animal tratado

M: macho

ACN: animal controle negativo

F: fêmea

ACP: animal controle positivo



Tabela 11. Totais de aberrações cromossômicas estruturais agrupando-se as amostras dos ensaios I, II III e IV.

Ensaio	Fração	Grupo	No. de metáfases	% metáfases anômalas
I	I	AT	800	4,1
		ACN	450	4,6
		ACP	50	26,0
II	I	AT	350	2,2
		ACN	200	2,5
		ACP	10	7,0
III	II	AT	700	4,0
		ACN	350	2,9
		ACP	50	26,0
IV	II	AT	400	2,2
		ACN	200	2,5
		ACP	10	7,0

AT : animal tratado

ACN: animal controle negativo

ACP: animal controle positivo



Tabela 12. Valores de t para comparação das médias das frequências de aberrações cromossômicas estruturais agrupando-se as amostras de mesmo tratamento. ns= $P > 0,05$; *= $P < 0,05$.

Ensaio	Grupos	t	G1	tc 5%	Significância
I	AT x ACN	0,59	12	1,78	ns
	AT x ACP	12,80	7	1,89	*
	ACN x ACP	13,30	5	2,01	*
II	AT x ACN	0,66	4	2,13	ns
	AT x ACP	5,28	3	2,35	*
	ACN x ACP	5,19	2	2,92	*
III	AT x ACN	1,22	10	1,81	ns
	AT x ACP	14,55	6	1,94	*
	ACN x ACP	12,38	4	2,13	*
IV	AT x ACN	0,26	4	2,13	ns
	AT x ACP	3,00	3	2,35	*
	ACN x ACP	5,19	2	2,92	*

AT : animal tratado

ACN: animal controle negativo

ACP: animal controle positivo



Tabela 13. Distribuições dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais nas amostras dos ensaios I e II. CT: cromatídicas, CM: cromossômicas.

Ensaio	Amostra	Quebras		Falhas		Outros	Total
		CT	CM	CT	CM		
I	AT1	3	1		1		5
	AT2	1		1			2
	ACN1				1		1
	ACN2	1	1		2		4
	AT3	3	3	2			8
	AT4		3	2	1		6
	AT5	1	1	2	1		5
	ACN3		1	2			3
	ACN4		1	2			3
	AT6		1	3			4
	AT7	1		1			2
	AT8	1		4			5
	ACN5	1		1			2
	ACN6	2	1				3
	ACP	6	8	4	3	5	26
II	AT1	1		1			2
	AT2	1	1				2
	AT3	1	1	1			3
	AT4		1				1
	ACN1	1		1			2
	ACN2	2	1				3
	ACP	4	7	2	3	4	20

AT : animal tratado

ACN: animal controle negativo

ACP: animal controle positivo



Tabela 14. Distribuição dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais nas amostras dos ensaios III e IV.

CT: cromatídicas, CM: cromossômicas.

Ensaio	Amostra	Quebras		Falhas		Outros	Total
		CT	CM	CT	CM		
III	AT1			2	1		3
	AT2			1	2		3
	AT3	1	1	4			6
	ACN1						0
	ACN2		1	2			3
	AT4	4	2				6
	AT5	1		1	1		3
	AT6	2		1			3
	ACN3	1	2				3
	ACN4		1	1			2
	AT7	1	2	1			4
	ACN5	2	1				3
	ACP	6	8	4	3	5	26
IV	AT1			1			1
	AT2	1					1
	AT3	3		1			4
	AT4	3		1			4
	ACN1	1		1			2
	ACN2	2	1				3
	ACP	4	7	2	3	4	20

AT : animal tratado

ACN: animal controle negativo

ACP: animal controle positivo

Tabela 15. Totais dos diferentes tipos de aberrações cromossômicas estruturais nas amostras tratadas, controles negativos e positivos nos ensaios I, II, III e IV, agrupando-se as amostras de mesmo tratamento. CT: cromatídicas, CM: cromossômicas

Ensaio	Grupo	No. de metáfases	Quebras		Falhas		Outros
			CT	CM	CT	CM	
I	AT	800	10	9	15	3	
	ACN	450	5	2	4	3	
	ACP	50	6	8	4	3	5
	Total		21	19	23	9	5
II	AT	350	3	3	2	0	
	ACN	200	3	1	0	0	
	ACP	10	4	7	2	3	4
	Total		10	11	4	3	4
III	AT	700	9	5	10	4	
	ACN	350	3	5	3	0	
	ACP	50	6	8	4	3	5
	Total		18	18	17	7	5
IV	AT	400	7	0	3	0	
	ACN	200	3	1	0	0	
	ACP	10	4	7	2	3	4
	Total		14	8	5	3	4

AT : animal tratado

ACN: animal controle negativo

ACP: animal controle positivo



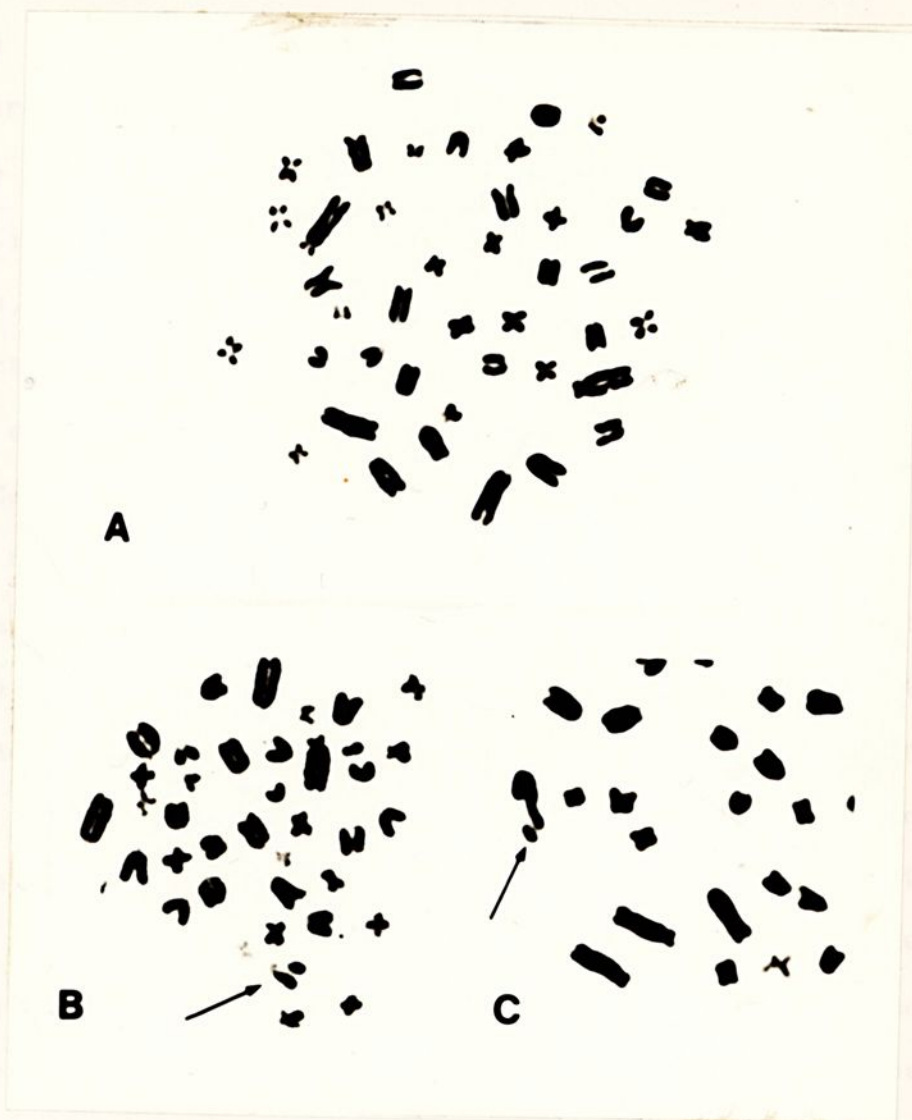


Figura 6. Metáfase de medula óssea de Rattus norvegicus sem anomalias (A) e metáfases parciais mostrando falha cromatídica (B) e quebra cromossômica (C).

IV. DISCUSSÃO

Os testes *in vivo* efetuados no presente estudo não permitiram detectar indução de alterações cicloativa e clastogênica pelas frações I e II do corante da beterraba, por meio dos parâmetros índice mitótico e das frequências de micronúcleos e aberrações cromossômicas, em células de medula óssea de *Rattus norvegicus*. Não houve variação interindividual significativa nas frequências de micronúcleos entre os indivíduos tratados e os controles negativos e positivos. Contudo, os indivíduos tratados com a fração II (com nitratos) na menor concentração (Ensaio III) mostraram variabilidade interindividual bem como seus respectivos controles negativos, e provavelmente por isso, embora os indivíduos tratados tenham apresentado frequências mais elevadas, essas não diferiram significativamente dos controles negativos. Variações dessa ordem podem ocorrer, como descrito por MATTER (1976), que analisou a frequência de micronúcleos em camundongo e hamster chinês e, observou que, embora as frequências se mantivessem similares nos diferentes indivíduos, às vezes ocorriam alterações que excediam os limites máximos esperados.

Os resultados obtidos nos testes de micronúcleos e de aberrações cromossômicas mostraram concordância. O teste de micronúcleos foi delineado por SCHMID (1975) para selecionar compostos químicos que agem sobre os cromossomos e o aparelho mitótico. Esse teste proporciona uma análise mais rápida do que o método de análise de células metafásicas, e pelos resultados de inúmeras investigações parece ser tão seguro quanto esse último (MATTER, 1976; TICE & IVETT, 1985; MADLE *et alii*, 1986).



Os controles positivos, tratados com ciclofosfamida, apresentaram frequências de micronúcleos e de aberrações cromossômicas significativamente maiores que os grupos controles negativos e os tratados. Todavia, a extrema redução do índice mitótico e a dificuldade em analisar células metafásicas, além da alteração entre as proporções de eritrócitos policromáticos e ortocromáticos, levam a sugerir o emprego de uma concentração mais baixa de ciclofosfamida. No planejamento deste estudo foi utilizada como base a concentração efetiva para ensaios de mutagênese em camundongos. As células de rato são mais sensíveis à ação da ciclofosfamida do que as de camundongo e de hamster chinês (MADLE, 1986). Portanto, uma concentração menor do que 5 mg/Kg de pc deve ser efetiva como referencial de efeito mutagênico e ao mesmo tempo deve facilitar a análise citogenética.

A boa concordância entre os resultados e os resultados negativos obtidos propiciaram a análise de um menor número de indivíduos na investigação do efeito de uma dose aguda das duas frações do corante na indução de aberrações cromossômicas (Ensaio II e IV).

Apesar de existirem evidências na literatura de que os ratos, ao contrário de outras espécies, apresentam diferenças relacionadas ao sexo quanto ao metabolismo de compostos químicos, o mesmo não foi notado neste estudo. Segundo SCHENKMAN *et alii* (1997), os machos metabolizam compostos xenobióticos mais rapidamente do que as fêmeas, todavia, após a castração as taxas de metabolismo diminuem. Essa eficiência seria atribuída não a diferentes quantidades de citocromo P-450, mas a uma diferença qualitativa nas características e constantes cinéticas das monoxigenases de função mista



(SCHENKMAN *et alii*, 1967).

A ação genotóxica de um composto químico não deve ser vista somente pelo aspecto intrínseco do composto, mas também como uma função das espécies biológicas que estão sendo expostas à sua ação, à atividade enzimática dos sistemas de ativação e inativação dessas espécies que estão sob controle gênico, ao tipo de tecido estudado e aos efeitos do ambiente, que podem incluir o tipo de nutrição, os níveis de exposição a outros agentes químicos e o modo de vida (HSU *et alii*, 1987).

O mecanismo de ativação oxidativa de compostos químicos depende não somente do mecanismo molecular e da enzima envolvida, mas também da razão de oxigênio disponível no tecido para as reações de oxidação. Essa razão é determinada pela taxa do metabolismo basal, é altamente dependente da espécie biológica e varia inversamente com o peso corpóreo. Desse modo, a ação de um composto que necessita ser bioativado por reações de oxidação será, de modo geral, tanto maior quanto menor for a espécie animal, embora isto dependa dos níveis de atividade dos citocromos P-450 e P-448 e outras enzimas do organismo em questão. De modo similar, as reações de destoxificação ou inativação se processarão de modo mais rápido quanto menor for o peso corpóreo (PARKE, 1983; 1987).

O processo de ativação metabólica pode levar à formação de compostos eletrofílicos capazes de reagir com os centros nucleofílicos do DNA, originando o complexo composto químico-DNA e consequentemente os eventos mutacionais, quando ocorre a duplicação do DNA (SINGER & GRUNBERGER, 1983). Essas reações são pré-requisito para a formação de tumores (NEUMANN, 1987); todavia, esse processo neoplásico pode ser controlado pelas reações de reparo dos danos



causados ao DNA (DOERJER *et alii*, 1984). Sabe-se que as células possuem uma série de enzimas que mantêm a integridade do código genético, por reparar o DNA lesado espontaneamente ou por agentes físicos e químicos. A eficiência das reações de reparo varia dependendo da espécie e do tipo celular em questão; além disso, a eficiência das reações será maior quanto maior for o tempo disponível para o reparo. Assim, células que permanecem em um período G0 ou G1 prolongados têm uma chance maior em reparar os danos ao DNA, antes que esses se convertam em um evento mutacional durante a duplicação (KIMBALL, 1987).

Existe um polimorfismo genético dos indivíduos com relação às reações de reparo do DNA (WOLFF *et alii*, 1987), e essa variação parece ser consideravelmente maior no homem, em comparação com espécies animais de laboratório que são geneticamente mais homogêneas (OESCH *et alii*, 1987). Segundo esses autores, as diferenças na eficiência das reações de reparo no homem podem ser intrínsecas, quer dizer, controladas geneticamente, ou essas enzimas de reparo podem ser influenciadas por fatores ambientais, tais como agentes indutores presentes nos alimentos.

Quanto aos animais de laboratórios, NEUMANN (1987) demonstra existir variação nos ratos e camundongos em relação à origem de lesões no DNA induzidas por diferentes compostos químicos e a eficiência do reparo, sendo que os ratos apresentam taxas de reparo do DNA mais elevadas. Com a intenção de analisar a excreção na urina de humanos e ratos de bases danificadas e desoxinucleosídeos do DNA que sofrem excisão, AMES (1986) desenvolveu um ensaio de cromatografia líquida de alta resolução para timina glicol, timidina glicol



e hidroximetil uracila. Os resultados por ele obtidos indicaram que o homem excreta na urina diariamente um total de cerca de 100 nanomolares desses três compostos, o que sugere que a grande maioria deles seja proveniente das reações de reparo do DNA, e não de outras fontes alternativas tais como alimentação ou ação da flora bacteriana. Esse total representa cerca de mil resíduos de timina oxidados por dia para cada das 6×10^{13} células do corpo. Desde que esses produtos são apenas três de um considerável grupo que causam danos ao DNA, provavelmente existem, por dia, muitas centenas de ataques oxidativos por célula no homem. Em comparação, os ratos que têm uma taxa metabólica específica maior e um curto período de vida, excretam cerca de quinze vezes mais de timina glicol e timidina glicol e dez vezes mais hidroximetil uracila por quilo de peso corpóreo em comparação com o homem.

Em vista disso, torna-se evidente a dificuldade que existe na extrapolação de resultados obtidos experimentalmente em animais para o homem, o que constitui, sem dúvidas, um dos principais problemas na área de mutagênese.

A possibilidade do emprego dos corantes de origem natural tem parecido vantajosa pois é evidente a receptividade do consumidor diante da palavra "natural". Todavia, nem sempre o que é de origem natural é inócuo ao organismo animal e humano.

O corante da beterraba é disponível para uso comercial, nos Estados Unidos, como suco concentrado ou em pó, em preparações contendo entre 0,3% a 1,0% do pigmento betanina. Preparações com um teor mais alto do pigmento seriam adicionadas em menor quantidade aos alimentos; contudo, elas não são disponíveis em virtude das restrições estipuladas em 1960 pela Emenda de Aditivos em Alimentos,



que limita a concentração do pigmento àquela naturalmente extraída (VON ELBE, 1977a;b). Além disso, à medida que se aumenta a concentração do pigmento, é necessário adicionar-se estabilizadores e assim o produto passa a não ser mais um corante vegetal natural (McCLELLAND, 1977). No entanto, embora as concentrações de betanina presentes em condições naturais difiram em função da variedade de beterraba empregada, muito frequentemente são suficientes para se obter uma boa coloração. PASCH *et alii* (1975) evidenciaram, por exemplo, que a quantidade necessária do corante da beterraba para conferir a cor desejável em iogurtes, sorvetes e sucos era duas vezes menor do que a do corante sintético FD & C Red no. 2.

Os resultados deste trabalho reforçam a possibilidade de que o corante da beterraba possa substituir corantes sintéticos como os FD & C Red nos. 2 e 4, cujos usos são severamente restritos pelo fato de não apresentarem valor de IDA (PASCH *et alii*, 1975). O FD & C no. 4 pode ser usado, nos Estados Unidos, em cerejas ao marasquinho, e a quantidade não deve exceder 150 ppm, enquanto que nenhum alimento poderá conter mais do que 30 ppm de FD & C Red no.2.

Resta porém uma dúvida em relação à presença de nitratos. O nitrito e o nitrato de sódio têm sido usados como fixadores da cor em produtos cárneos, além de contribuírem para a melhoria de sabor e inibirem o desenvolvimento de bactérias (WASSERMAN & TALLEY, 1972; CHRISTIANSEN *et alii*, 1973). Contudo, o uso desses sais tem sido questionado devido à sua capacidade de formarem no estômago compostos N-nitrosos, com atividade carcinogênica.

Em vista disso, VON ELBE *et alii* (1974a) testaram a capacidade do corante da beterraba, em substituição a sais nítricos,



com relação à manutenção da cor em linguças. O experimento constou de um grupo controle, constituído por carne moída sem agentes colorantes e de três grupos tratados, um com carne moída contendo os níveis máximos legais de nitrato e nitrito de sódio; nos outros dois grupos foi adicionado o pó com nitratos e o pó sem nitratos da beterraba com 0,06% de betanina, nas concentrações finais de 33 ppm, 45 ppm e 56 ppm para o primeiro e 45 ppm para o segundo. As carnes do grupo controle apresentaram uma coloração acinzentada e, entre os grupos tratados, todos exibiram coloração semelhante. Em virtude da insolubilidade do corante da beterraba em gorduras, as partículas lipídicas do preparado mantiveram sua cor, o que foi considerado um excelente resultado. O sabor foi intensificado nos produtos contendo nitrito-nitrato, mas tal característica não foi notada pelos provadores, que manifestaram maior preocupação com a coloração. Entretanto, a maior surpresa apareceu quando se efetuou a contagem microbiológica, pois essa se manteve baixa nas amostras contendo nitrito e nitrato e o pó com nitratos da beterraba. Em decorrência disso, procedeu-se à determinação do conteúdo de nitratos nesse pó, encontrando níveis de 8 mg de nitratos/100 g de pó, o que deve ter resultado em uma concentração menor do que 1 ppm no produto final, mas que pareceu suficiente para agir como conservante. Em vista desses resultados, ficou comprovada a utilização do corante da beterraba com nitratos como intensificador de produtos cárneos e, além disso, como substituto dos sais de nitrito e nitratos.

Atualmente, existem muitos laboratórios empenhados em conhecer o processo que conduz à formação de tumores induzidos por compostos químicos e que está intimamente relacionado com o modo de vida e hábitos alimentares do indivíduo (CLAYSON, 1981; AMES,



1984a;b; CARR, 1985; FURUHATA & MATSUSHIMA, 1986). Como evento mutacional é um dos pré-requisitos para a ocorrência do processo carcinogênico, a avaliação do potencial mutagênico de compostos químicos presentes nos alimentos, nos fármacos e na água é de importância para a saúde pública.

A similaridade química entre agentes mutagênicos e carcinogênicos tem reforçado a hipótese de que tipos específicos de dietas estão relacionados com o aparecimento de cânceres de mama, do cólon e do esôfago (CARR, 1985). A relação entre a alimentação e câncer iniciou-se com os estudos de BURKITT (1971) em populações africanas e americanas, demonstrando que alimentos ricos em fibras vegetais teriam um efeito protetor na carcinogênese intestinal, o que foi posteriormente confirmado por NIGRO (1981), JENSEN *et alii* (1982) e REDDY (1982; 1983a;b). Segundo esses autores, o efeito protetor pode estar relacionado com a capacidade de adsorção, diluição e inibição do metabolismo de compostos mutagênicos, ainda que tal efeito dependa da composição e da origem das fibras, pois essas compreendem um grupo de carboidratos contendo celulose, hemicelulose, pectina e outras substâncias tais como a lignina, que são resistentes à digestão no trato intestinal (CUMMINGS, 1987). Diferentes tipos de fibras não nutritivas, incluindo as ligninas, têm um papel fisiológico muito importante, podendo ligar-se a compostos tumorigênicos, alterando a circulação entero-hepática dos metabólitos desses compostos provavelmente por aumentar a massa fecal e diluindo-os (FIALA *et alii*, 1985). Em contraposição, tais afirmações não são confirmadas pelos estudos de JAIN *et alii* (1980). Todavia, esses dados conflitantes são justificados por REDDY (1982) como



devidos a variações na natureza do composto químico empregado como agente genotóxico, na susceptibilidade da linhagem do animal utilizado e na composição das dietas.

A fração II do corante estudado difere da fração I por conter nitratos e não conter fibras. A diferença na quantidade de fibras pode ser explicada devido as diferentes formas terem sido extraídas de variedades de beterraba de locais diferentes e não cultivadas sob as mesmas condições.

Desde os primeiros relatos feitos por MAGEE & BARNES (1956), sobre a indução de câncer no fígado de ratos alimentados por dimetilnitrosamina, mais de oitenta tipos diferentes de nitro-compostos foram descritos como agentes genotóxicos (GOLDIN, 1986). O potencial tóxico desses compostos reside no fato de que eles reagem com aminas e amidas secundárias e terciárias, originando as nitrosaminas e nitrosamidas (MIRVISH, 1975). Os nitro-compostos podem ter diferentes origens; a principal é aquela na qual o nitrito se origina das reações de redução do nitrato pela microflora da cavidade oral (TANNENBAUM *et alii*, 1974) ou da atividade microbiana no intestino (TANNENBAUM *et alii*, 1978). A alimentação é considerada a fonte secundária de origem desses compostos (LIJINSKY & TAYLOR, 1977). Muitos vegetais podem acumular, em certos órgãos, como folhas (espinafre), caules (alpo) e raiz (beterraba), altas concentrações de nitratos que podem ser convertidos em nitrito durante o armazenamento. Além desses alimentos, os nitritos são adicionados às carnes e outros produtos alimentícios, como intensificadores da cor e como inibidores do crescimento de *Clostridium botulinum*. O uso de nitritos foi introduzido há cerca de 50 anos e os níveis permitidos não devem exceder 200 ppm, estando o conteúdo médio em 100 ppm



(NACCARATO *et alii*, 1987). Alimentos salgados, em conserva e defumados também contêm nitrato e nitrosaminas, bem como outros compostos resultantes de processos de fermentação. Uma terceira fonte de nitritos é a redução do nitrato em nitrito que ocorre no estômago. Indivíduos normais, em jejum, possuem pequenas quantidades de nitritos no estômago em condições fisiológicas normais; todavia, essa concentração aumenta consideravelmente quando o pH gástrico aumenta em níveis acima do normal, permitindo o crescimento de bactérias redutoras do nitrato (TANNENBAUM *et alii*, 1978).

Há que se considerar, contudo, que a segunda fonte geradora de compostos nitrosos, a alimentação, também é fonte de outros compostos que agem como "caçadores de nitritos e nitratos", como por exemplo o ácido ascórbico (NACCARATO *et alii*, 1987), presente na fração II do corante em uma concentração mais elevada do que a de nitratos, o que está dentro das normas JECFA/WHO.

O ácido ascórbico foi a primeira substância de ocorrência natural considerada como bloqueadora efetiva da formação de nitrosaminas (MIRVISH, 1981). O mecanismo de alfa-hidroxilação é considerado como o passo principal nas reações de ativação para a formação de nitrosaminas incluindo outras reações metabólicas, muitas das quais resultam na destoxificação (DIPPLE *et alii*, 1985). O ácido ascórbico age reduzindo formas ativas de nitrogênio (trióxido de nitrogênio e tetróxido dinitrogênio) em óxido nítrico, diminuindo assim a concentração de espécies ativas para as reações de nitrosaminação e nitrosamidação (MIRVISH, 1975).

Dos resultados obtidos nos ensaios *in vivo* não se denota qualquer diferença na ação dos corantes sem nitratos e com nitratos;



entretanto, torna-se necessário considerar outros aspectos envolvidos no processo de metabolismo desses compostos que possam interferir na extrapolação de resultados obtidos em experimentos com animais, para o homem.

A saliva humana contém quantidades variáveis de nitratos em condições fisiológicas normais e esses são parcialmente reduzidos a nitritos por bactérias comumente presentes na cavidade oral, sendo encontrados níveis de nitritos na saliva entre 6 a 10 ppm (GOLDIN, 1986). Tais compostos chegam ao estômago por meio de transporte ativo. Além dos nitritos provenientes da saliva e dos adicionados intencionalmente aos alimentos, o estômago contém esses mesmos compostos que são provenientes dos alimentos que naturalmente contém nitratos. Desse modo, a quantidade de nitritos no estômago varia de indivíduo para indivíduo e depende do tipo de alimentação consumida (NAS, 1981).

O transporte ativo de nitratos para o estômago ocorre no homem e em outros animais de laboratório, mas não ocorre nos ratos (NACCARATO *et alii*, 1987). Além do mais, comparando-se o homem e o rato, a fonte de nitratos provenientes da alimentação é bastante diferente, acrescentando-se o fato de que no suco gástrico de indivíduos normais em jejum existe uma concentração baixa de nitritos, que aumenta significativamente quando o pH do suco gástrico eleva-se a níveis acima do normal, como por exemplo a que ocorre após as refeições (TANNENBAUM *et alii*, 1977). Em pH ácido, os nitritos gástricos são convertidos em ácido nitroso, que é absorvido ou catabolizado em óxidos nitroso (N₂O) e nítrico (NO), mas como o pH do estômago não se torna ácido antes de uma hora após as refeições, parece que existe um tempo suficiente para que os nitritos exerçam sua ativi-



dade.

O estômago, portanto, parece ser o sítio principal das reações de nitrosaminação ou nitrosamidação porque requerem um pH ácido e a ocorrência dessas reações está associada à concentração de nitro-compostos, tanto no estômago como nos alimentos, às condições fisiológicas do indivíduo, ao pH do estômago e à ausência ou presença de nucleófilos ou inibidores dessas reações, como o ácido ascórbico e alguns compostos polifenólicos (MIRVISH, 1981; NACCARATO *et alii*, 1987).

Na espécie humana, outras variáveis podem interferir na formação de nitrosaminas, como por exemplo a ingestão de certos analgésicos (PIENKOWSKA *et alii*, 1985), anti-histamínicos e agrotóxicos (LIJINSKY *et alii*, 1972), e a presença de algumas anomalias gástricas, como a gastrite atrófica crônica, que proporciona o crescimento de bactérias estomacais que ativam as reações de nitrosaminação.

Dentre os compostos nitrosos, as nitrosamidas são mais instáveis que as nitrosaminas, mas em contraposição, podem exercer ação carcinogênica direta por não requererem ativação metabólica. As nitrosaminas, após ingestão oral, particularmente quando em pequenas doses por um longo período de tempo, sofrem ativação metabólica e podem ser convertidas em agentes carcinogênicos.

A atividade das monoxigenases já foi demonstrada no trato gastrintestinal de ratos (SEITZ *et alii*, 1978), bem como a atividade de sistemas de conjugação (SPARNINS *et alii*, 1982; FARINATI *et alii*, 1985), com relação a diferentes compostos químicos. Em relação aos nitro-compostos, reconhece-se a família do citocromo P-450 como a



envolvida na sua metabolização (TU & YANG, 1985). APPEL *et alii* (1987) sugeriram que a formação de nitrito ocorre através do citocromo P-450 que cataliza a redução de um elétron da nitrosamina para formar amina secundária e óxido nítrico e, segundo esses mesmos autores, a formação de nitritos representa um passo alternativo na geração de intermediários alquilantes e pode representar uma reação de destoxificação e não de ativação.

Embora não existam dúvidas sobre a possibilidade de aplicação do corante da beterraba como aditivo em alguns gêneros alimentícios, não é possível apontar, todavia, qual das duas frações do corante empregadas neste estudo deva ser preferida. A fração II seria uma fonte geradora adicional de nitro-compostos no trato gastrointestinal; contudo, pode substituir a adição de nitrito e nitrato de sódio em produtos cárneos, por exemplo.

No entanto, os corantes naturais, mesmo que seja comprovada sua segurança do ponto de vista genético e toxicológico, apresentam algumas dificuldades técnicas associadas ao seu emprego, em particular quanto à estabilidade, solubilidade e baixa intensidade de coloração (MC CLELLAND, 1977). Esses problemas poderão ser contornados com o aperfeiçoamento de procedimentos técnicos, que contemplem também o aspecto econômico.



V. RESUMO E CONCLUSOES

Dentre os produtos do metabolismo secundário vegetal, os pigmentos ou corantes têm despertado especial interesse, pela sua importância na indústria de alimentos. No caso de oferecerem menos riscos à saúde humana, poderão vir a substituir os corantes sintéticos, principalmente os que são questionados quanto à possíveis reações alérgicas. Este estudo teve por objetivo avaliar a atividade mutagênica das frações I (sem nitratos e com fibras) e II (com nitratos e sem fibras) do corante da beterraba em ensaios *in vivo*.

Os ensaios consistiram na análise de células de medula óssea de Rattus norvegicus, machos e fêmeas, com 6 a 7 semanas de idade, pesando 90 a 100 g e tratados por via oral durante uma semana com as frações I e II nas doses de 0,02 mg e 5,0 mg de betanina/100 g de peso corpóreo/dia. No oitavo dia, os animais foram sacrificados e tiveram seus fêmures removidos para a coleta do material. Os grupos controles consistiram em controles negativos sem qualquer tratamento e em controles positivos, cujos animais foram tratados com ciclofosfamida na dose de 5,0 mg/100 g peso corpóreo, 24 horas antes do sacrifício.

A análise das lâminas, foi executada em teste cego. Os parâmetros analisados foram o índice mitótico (IM) e as frequências de micronúcleos e de anomalias cromossômicas.

Em relação aos resultados obtidos, não se observaram diferenças significativas quanto ao índice mitótico e as frequências de micronúcleos e anomalias cromossômicas, quando as amostras trata-



das com as duas doses das frações I e II do corante foram comparadas com as amostras dos controles negativos. Todavia, ambas diferiram significativamente das amostras dos controles positivos que apresentaram grave redução do índice mitótico e frequências elevadas de micronúcleos e anomalias cromossômicas estruturais.

Esses resultados sugerem que os compostos presentes nas frações estudadas do corante da beterraba foram metabolizados e degradados em derivados não mutagênicos, razão pela qual não foram observados efeitos cicloativos ou clastogênicos in vivo.

Em vista dos resultados obtidos quanto à mutagenicidade do corante da beterraba, parece viável o seu uso como aditivo alimentar em substituição a outros corantes sintéticos de conhecida toxicidade, apesar de não serem consideradas as dificuldades técnicas e econômicas relativas ao seu emprego.



VI. SUMMARY

The recent growth of food industry has made food additives a relevant cause of human cancer, particularly due to the mutagenic activity of several synthetic food colors. The knowledge of mutagenic effect of natural food colors gives scientific support for the replacement of synthetic by natural ones.

Two different forms of beet root colors were tested: the form I without nitrate residues and the form II with nitrate residues. The coloring active principle of both extracts is the betanin pigment which gives the characteristic beet root purple color.

Mutagenic effects were tested in vivo. The experiments were carried out with bone marrow cells of males and females Rattus norvegicus var. Wistar six-seven weeks old, 90-100 g of weight, orally treated with both forms for one week, with 0.02 mg and 5.0 mg of betanin per 100 g of body weight per day; the bone marrow material was collected at the 8th day. For the bone marrow cell experiments two different control groups were established: a negative group of untreated animals and a positive group of animals treated with 5.0 mg of cyclophosphamide per 100 g of body weight 24 hours before sacrifice.

Mitotic index (MI), chromosome anomaly (CA) and micronucleus frequencies were recorded. Slides of bone marrow were analysed in blind tests.

There were no differences in MI, micronucleus, and CA frequencies, when the treated samples were compared with the



negative control, but both samples differed significantly from the positive control which presented a gross MI reduction and an increased micronucleus and CA frequency.

These results suggest that the compounds of both forms were metabolized and inactivated in non-mutagenic derivatives, justifying the absence of *in vivo* cycloactive and clastogenic effects.

The present results seem to support that beet root color is a safer alternative food additive. Economic and technical restraints were not considered.



VII.REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ABRAHAN,S.; MAHAHANS,S.; KESAVAN, P. Inhibitory effects of dietary vegetables on the in vivo clastogenicity of cyclophosphamide. Mutation Research, 172: 51-54, 1986.
- ADAMS,J. & VON ELBE,J. Betanine separation and quantification by chromatography on gels. Journal of Food Science, 42: 410, 1977.
- AMES,B. Dietary carcinogens and anti-carcinogens. Clinical Toxicology, 22: 291-301, 1984a.
- AMES,B. The detection of environmental mutagens and potencial carcinogens. Cancer, 53: 2034-2040, 1984b.
- AMES,B. Food constituents as a source of mutagens, carcinogens, and anticarcinogens. In Genetic Toxicology of the Diet. KNUDSEN,I. ed. Alan R. Liss, Inc. 1986. p.3-32.
- ANDRIANOVA,M. Carcinogenic properties of the red food dyes Amaranth, SM Purple, and 4R Purple. Sopr Pitan, 29: 61, 1970.
- ANTUNES,A. & CANHOS,V. Aditivos em Alimentos. Governo do Estado de São Paulo. Secretaria da Indústria, Comércio, Ciência e Tecnologia. Coordenadoria da Indústria e Comércio, 1986. 179p.



- APPEL,K.; GORSTDORF,S.; SCHEPER,T.; BAUSZUS,M.; HILDEBRANDT,A.
Enzymatic denitrosation of diphenylnitrosamine: activation or
inactivation? Archives of Toxicology, 60: 204-208, 1987.
- APPLEBAUM,S. & BIRK,Y. Saponins. In: Herbivores: their interaction
with secondary plant metabolites, ROSENTHAL,G.; JANZEN,D. eds.
Academic Press, New York. 1979. p.539-566.
- APPLEBAUM,S. & GUEZ,M. Comparative resistance of Phaseolus vulgaris
beans to Callosobruchus chinensis and Acanthoscelides obtectus
(Coleoptera: Bruchidae) the differential digestion of soluble
heteropolysaccharides. Entomologia Experimental Applied, 15:
203-207, 1972.
- APPLEBAUM,S.; GESTETNER,B.; BIRK,Y. Physiological aspects of host
specificity in the Bruchidae - IV. Developmental incompatibili-
ty of soybeans for Callosobruchus. Journal Insect Physiology,
11: 611-616, 1965.
- AURSTAD,K. & DAHLE,H. The effect of heat treatment, U.V. and gamma
radiation on some beet root pigments. Z. Lebensm. Untersforsch,
151: 171, 1973.
- BECKMAN,C.; ROY,R.; SPROULE,A. Modification of radiation-induced
sex-linked recessive lethal mutation frequency by tocopherol.
Mutation Research, 105: 73-77, 1982.



- BERENBLUM, I. The mechanism of carcinogenesis. Cancer Research, 1: 807-814, 1941.
- BOCK, K.; LILIENBLUM, W.; FISCHER, G.; SCHIMER, G.; BOCK-HENNIG, B. The role of conjugation reactions in detoxication. Archives of Toxicology, 60:22-29, 1987.
- BRUSICK, D. Consequences of genotoxic effects. In Carcinogenesis and Mutagenesis Testing. DOUGLAS, J. eds. The Humana Press, 1984a. p.17-38.
- BRUSICK, D. Cytogenetic assays. In Carcinogenesis and Mutagenesis Testing. DOUGLAS, J. ed. The Humana Press, 1984b. p.265-76.
- BRUSICK, D.; SIMMON, V.; ROSENKRANS, H.; RAY, V.; STAFFORD, R. An evaluation of the *Escherichia coli* WP2 and WP2 UVrA reverse mutation assay. Mutation Research, 76: 169-190, 1980.
- BUNYAN, P.; COOMES, T.; ELTON, G. Impact of risk assessment and the control of chemicals on assuring the safety on the food supply. Fundamental and Applied Toxicology, 4: 5263-5277, 1984.
- BURKITT, D. Epidemiology of cancer of the colon and rectum. Cancer, 28: 3-13, 1971.
- CARR, B. Chemical carcinogens and inhibitors of carcinogenesis in the human diet. Cancer, 55: 218-224, 1985.



CHATTERJEE, M. & BANERJEE, M. Selenium mediated dose-inhibition of 7,12-dimethylbenzantracene-induced transformation of mammary cells in organ culture. Cancer Letters, 17: 187-195, 1982.

CHRISTIANSEN, L.; JOHNSON, R.; KAUTTER, D.; HOWARD, J.; AUNAN, W. Effect of nitrite and nitrate on toxin production by Clostridium botulinum and on nitrosamine formation in perishable canned comminuted cured meat. Applied Microbiology, 25: 357, 1973.

CLAYSON, D. International comission for protection against environmental mutagens and carcinogens and carcinogenesis enhancers. Mutation Research, 86: 217-229, 1981.

CLYDESDALE, F. Color measurement. In Current Aspects of Food Colorants. FURIA, T. ed. CRC Press, Inc. Cleveland, Ohio, 1977. p.1-16.

COLLINS, T.; McLAUGHLIN, J.; GRAY, G. Teratology studies on food colorings. I. Embryotoxicity of amaranth (FD&C Red No.2) in rats. Food Cosmetic Toxicology, 10: 619, 1972.

CUMMINGS, J. Dietary fiber. American Journal of Clinical Nutrition, 45: 1040-1043, 1987.

DARROUDI, F.; TARGA, H.; NATARAJAN, A. Influence of dietary carrot on cytostatic drug activity of cyclophosphamide and its main directly acting metabolite: Induction of sister-chromatid exchanges in normal human lymphocytes, chinese hamster ovary cells, and their DNA repair-deficient cell lines. Mutation Research, 198: 327-355, 1988.



DE LEY, J. & KERSTERS, K. Biochemical evolution in bacteria. In Comprehensive Biochemistry. FLORKIN, E. & STOTZ, H. eds. Elsevier, Amsterdam 29B:1-77, 1975.

DIPPLE, A.; MICHEJDA, C.; WEISBURGER, E. Metabolism of chemical carcinogens. Pharmacology and Therapeutics, 27: 265-296, 1985.

DOERJER, G.; BEDELL, M.; OESCH, F. DNA adducts and their biological relevance. In Mutations in Man. OBE, G. ed. Springer Verlag, Heidelberg, 1984. p.20-34.

DUNHAM, W.; ZUCKERKANDL, E.; REYNOLDS, R.; WILLOUGHBY, R.; MARCUSON, R.; BARTH, R.; PAULING, L. Effects of intake of L-ascorbic acid on the incidence of dermal neoplasms induced in mice by ultra-violet light. Proceeding National Academic Science, 79: 7532-7536, 1982.

EPSTEIN, S. & RUHRBORN, G. Recommended procedures for testing genetic hazards from chemicals, based on the induction of dominant lethal mutation in mammals. Nature, 230: 459-460, 1971.

FARINATI, F.; LIEBER, C.; GARRO, A. The effects of chronic ethanol consumption on carcinogen metabolizing systems in rat upper alimentary tract. Gastroenterology, 88: 1378, 1985.

FIALA, E.; REDDY, B.; WEISBURGER, J. Naturally occurring anticarcinogenic substances in foodstuffs. Annual Review of Nutrition, 5: 295-321, 1985.



FOOD ADDITIVES ORGANIZATION (FAO). General Principles governing the use of food additives. FAO (Food Additives Organization) Nutrition meetings report series, (15), 1957; WHO (World Health Organization) Technical Report Series, (129), 1957.

FRIDOVICH, I. Superoxide dismutase in biology and medicine. In Pathology of Oxygen. FRIDOVICH, I. ed. Academic Press, New York. Ch 1, p.1-19, 1982.

FURUHATA, C. & MATSUSHIMA, T. Mutagens and carcinogens in foods. Annual Review of Nutrition, 6: 67-94, 1986.

GEBHART, E.; WAGNER, H.; GRZIWOK, K.; BEHNSEN, H. The action of anticlastogens in human lymphocyte cultures and their modification by rat-liver S9 mix. II. Studies with vitamin C and E. Mutation Research, 149: 84-94, 1985.

GIMMLER, M.; MARQUES, E.; JOHNSTON, R. Action of the pyrrolizidine alkaloid integerrimine in inducing meiotic chromosome aberrations in male mice. Revista Brasileira de Genética, X: 31-34, 1987.

GOLDIN, B. The metabolism of the intestinal microflora and its relationship to dietary fat, colon and breast cancer. In Dietary Fat and Cancer. Alan R. Liss, Inc. 1986. p.655-685.

GOODWIN, T. ed. Biochemistry of Plant Pigments. Academic Press, London, 2 vols., 1976.



- HANNINEN,O.; LINDSTROM-SEPPA,P.; PELSONEN,k. Role of gut in xenobiotic metabolism. Archives of Toxicology, 60: 34-36, 1987.
- HANSEN,W.; DAVIS,K.; FITZHUGH,O.; NELSON,A. Chronic toxicity of Ponceau 3R. Toxicology Applied Pharmacology, 5: 105, 1963.
- HARTMAN,P. Nitrates and Nitrites: Ingestion, pharmacodynamics and toxycology. In Chemical Mutagens. DE SERRES,F. & HOLLAENDER,A. eds. New York. Plenum, vol 7. 1982.p.211-294.
- HARTMAN,P. Review: Putative mutagens and carcinogens in foods. 1. Nitrate/nitrite ingestion and gastric mortality. Environmental Mutagenesis, 5: 111-121, 1983.
- HAYES,J.; COULTHWAITE,R.; STOCKMAN,P.; HUSSEY,A.; MANTLE,T.; WOLF,C. Glutathione-S-transferase subunits in the mouse and their catalytic activities towards reactive eletrophiles. Archives of Toxicology, Supplement 10: 136-146, 1987.
- HEDDLE,J. A rapid in vivo test for chromosomal damage. Mutation Research, 18: 187-190, 1973.
- HICKS,M. The scientific basis for regarding vitamin A and its analogues as anticarcinogenic agents. Proceeding Nutrition Society, 42: 83-101, 1983.
- HIRONO,I. Carcinogenicity of plant constituents: pyrrolizidine alkaloids, flavonoids, bracken fern. In Genetic Toxicology of Diet. KNUDSEN,I. ed. Alan R. Liss, Inc. New York, 1986. p.45-53.



HSU, I.; HARRIS, C.; LIPSKY, M.; SNYDER, S.; TRUMP, B. Cell and species differences in metabolic activation of chemical carcinogens. Mutation Research, 177: 1-7, 1987.

HUXTABLE, R. Herbal teas and toxins: novel aspects of pyrrolizidine poisoning in the United States. Perspective Biologie Medical, 214: 1-14, 1980.

HUXTABLE, R.; LUTHY, J.; ZWEIFEL, U. Toxicity of comfrey-pepsin preparations. New England Journal of Medicine, 315: 1095, 1986.

ISHIDATE, M.; SOFUNI, K.; YOSHIKAWA, K.; NOHMI, T.; SAWADA, M.; MATSUOKA, A. Primary mutagenicity screening of food additives currently used in Japan. Food and Chemical Toxicology, 22: 623-636, 1984.

JAIN, M.; COOK, G.; DAVIS, F.; GRACE, M.; HOWE, G.; MILLER, A. A case-control study of diet and colo-rectal cancer. International Journal of Cancer, 26: 757-768, 1980.

JECFA. Tenth report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. Specifications for the identity and purity of food additives and their toxicological evaluation: some emulsifiers and stabilisers and certain other substances. WHO (World Health Organization). Technical Report Series, (373), 1967.

JECFA. Twenty-sixth report. Evaluation of certain food additives and contaminants. Technical Report Series (683):7-51, 1982.



JENSEN,O.; MAC LENNAN,R.; WAHRENDORF,J. Diet, bowel function, fecal characteristics and large bowel cancer in Denmark and Finland. Nutritional Cancer, 4: 5-19, 1982.

JUHLIN,L. Intolerance to food and drug additives. Allergic reactions to drugs, 63: 639-655, 1983.

KADA,T.; INOUE,T.; MORITA,K.; NAMIKI,M. Dietary desmutagens. In Genetic Toxicology of the Diet. KNUDSEN,I. ed. Alan R. Liss, Inc., New York, 1986. p.245-53.

KADA,T.; KANEKO,K.; MATSUZAKI,S.; MATSUZAKI,T.; HARA,Y. Detection and chemical identification of natural bioantimutagens. A case of the green tea factor. Mutation Research, 150: 127-132, 1985.

KAPPUS,H. Oxidative stress in chemical toxicity. Archives of Toxicology, 60: 144-149, 1987.

KIMBALL,R. The development of ideas about the effect of DNA repair on the induction of gene mutations and chromosomal aberrations and chromosomal aberrations by radiation and chemicals. Mutation Research, 186: 1-34, 1987.

KLAUJ,H. Present problems of food colours. Bibliotheca Nutritio et Dieta, 29: 75-81, 1980.



KNUDSEN, I. Natural, processed, and artificial mutagens in food-significance and consequences. In Mutagens in Our Environmental ed. Alan R. Liss, Inc., New York, 1982. p.315-326.

KRANTZ, C.; MONIER, M.; WAHLSTROM, B. Absorption, excretion, metabolism and cardiovascular effects of beetroot extract in the rat. Food Cosmetic Toxicology, 18: 363-366, 1980.

KVITKO, K. & GIMMLER, M. Effects of integerrimine on the implantation and intrauterine development of mice. Revista Brasileira de Genética, IX: 439-451, 1986.

LEGATOR, M. Host mediated assay. In First Annual Course in the Principles and Practiques of Genetic Toxicology. Galveston, Texas, 1976.

LEVIN, D. & YORK Jr. B. The toxicity of plant alkaloids: an ecogeographic perspective. Biochemical Systematic Ecology, 6:61-76: 1978.

LIJINSKY, W.; CONRAD, E.; VAN de BOGART, R. Nitrosamines formed by drug/nitrite interaction. Nature, 239:165-168, 1972.

LIJINSKY, W. & TAYLOR, H. Nitrosamines and their precursors in food. In Origins of Human Cancer. Book C. Human Risk Assessment. HIATT, H.; WATSON, J.; WINSTEN, J. eds. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York. 1977. p.1579-1590.



- LINDNER, E. Toxicologia de los Alimentos. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 1984. p.11.
- MABRY, T. & DREIDING, A. The betalaines. In Recent Advances in Phytochemistry. MABRY, T.; ALSTON, R. & RONECKLES, V. eds. Appleton-Century-Crafts, New York, 1968.
- MADLE, E.; KORTE, A.; BEEK, B. Species differences in mutagenicity testing. II. Sister-chromatid exchange and micronucleus induction in rats, mice and chinese hamsters treated with cyclophosphamide. Mutagenesis, 1: 419-422, 1986.
- MAGEE, P. & BARNES, J. The production of malignant primary hepatic tumors in the rat feeding dimethylnitrosamine. Britanical Journal of Cancer, 10: 114-122, 1956.
- MALONE, M. The pharmacological evaluation of natural products-general and specific approaches to screening ethnopharmaceuticals. Journal of Ethnopharmacology, 8: 127-47, 1983.
- MANOHARAN, K. & BANERJEE, M. Beta-carotene reduces sister chromatid exchanges induced by chemical carcinogens in mouse mammary cells in organ culture. Cell Biology International Reports, 9:733-789, 1985.



- MARTIN,P.; THORBURN,M.; HUTCHINSON,S.; BRAS,G.; MILLER,C.
Preliminary findings of chromosomal studies on rats and humans with veno-occlusive disease. British Journal of Experimental Pathology, 53:374-380, 1972.
- MATTER,B. Failure to detect chromosome damage in bone-marrow cells of mice and chinese hamster exposed *in vivo* to some ergot derivatives. Journal of Institute Medical Research, 4: 382-392, 1976.
- MAZLIAK,P. Chemistry of plant cuticles. Progress in Phytochemistry, 1: 49- 112, 1968.
- MC CLELLAND,C. Economic constraints on the use of naturally derived food colors. In Current Aspects of Food Colorants. FURIA,T. ed. CRC Press, Inc. 1977. p.67-76.
- MC LEAN,E. The toxic actions of pyrrolizidine (Senecio) alkaloides. Pharmacology Review, 22: 429-483, 1970.
- MIRVISH,S. Formation of N-nitroso compounds chemistry, kinetics, and *in vivo* occurrence. Toxicology Applied Pharmacology, 31: 325-351, 1975.
- MIRVISH,S. Ascorbic acid inhibition in chemical, food, and biological systems. In Inhibition of Tumor Formation and Development. ZEDECK,M. & LIPKIN,M. eds. Plenum Press, New York. 1981. p.101-126.



MOURA,L.; CASCON,S. & GUIMARÃES,I. Corantes da beterraba e sua aplicação em alimentos. EMBRAPA (PESQUISA EM ANDAMENTO). No.004,1983.

NACCARATO,R.; FARINATI,F.; CARDIN,F.; & DI MARIO,F. Alimentary habits and gastric nitrosamines. In Nutrition in Gastrointestinal Disease. BARBARA,L.; PORRO,G.; CHELI,R.; LIPKIN,M. eds. Raven Press, New York. 1987. p.59-67.

NARDI,N.; GIMMLER,M.; LEITE,B. Antimitotic action of integerrimine in rats. Revista Brasileira de Genética, 111: 387-393, 1980.

NATARAJAN,A. & OBE,G. How do in vivo mammalian assays compare to in vitro assays in their ability to detect mutagens? Mutation Research, 167:189-201, 1986.

NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES (NAS). The health effects of nitrate, nitrite and N-nitroso compounds. Part 1. NAS,Washington,D.C. 1981.

NETER,J. & WASSERMAN,W. Applied Linear Statistical Models. Richard D. Irwin, Inc., Homewood, Illinois. 1974. p.636-684.

NEUMANN,H. Variables influencing DNA-binding in mouse liver. Mouse Liver Tumors Archives of Toxicology, Supplement, 10: 180-189, 1987.



- NIEUWHOF, M. & DE BRUYN, J. A heritable color deviation in red table beets (Beta vulgaris var. Rubra L.). Emphtica, 21: 27, 1972.
- NIGRO, N. Fat, fiber and other modifiers of intestinal carcinogenesis: A strategy for prevention. Banbury Reports, 7: 83-94, 1981.
- NILSSON, T. The pigment content in beet root with regard to cultivar, growth, development an growing conditions. Sweden Journal Agricultural Research, 3: 201, 1973.
- NOONAN, J. The present and future status of certified color additives: the uncertain additives. In Current Aspects of Food Colorants. FURIA, T. ed. CRC Prews, Inc., Cleveland, Ohio, 1977. p.61-66.
- OESCH, F. Significance of various enzymes in the control of reactive metabolites. Archives of Toxicology, 60: 174-178, 1987.
- OESCH, F.; AULMANN, W.; PLATT, K.; DOERJER, G. Individual differences in DNA repair capacities in man. Mouse Liver Tumors. Archives of Toxicology, Supplement, 10: 172-179, 1987.
- PARKE, D. Survey of drug-metabolising enzymes. Biochemical Society Transactions. 11: 457-458, 1983.
- PARKE, D. Activation mechanisms to chemical toxicity. Archives of Toxicology, 60: 5-15, 1987.



PASCH, J. & VON ELBE, J. Betalaines as confectionery colorants. Candy Snack Industry, 142: 32, 1977.

PASCH, J.; VON ELBE, J.; SELL, R. Betalaines as colorants in dairy products. Journal Milk Food Technology, 33: 25, 1975.

PETO, R.; DOLL, R.; BUCKLEY, J.; SPORN, M. Can dietary beta-carotene materially reduce human cancer rates? Nature, 290: 201-203, 1981.

PIATELLI, M. Betalaines. In Chemistry and Biochemistry of Plant Pigments. GOODWIN, T. ed. Academic Press, London, New York, San Francisco, 1976. p.560-592.

PIENKOWSKA, K.; GALCY, H.; HOZIOOROWSKA, J. Protective action of ascorbic acid against mutagenicity of aminopyrine plus nitrite. Polish Journal of Pharmacology and Pharmacy, 37: 601-607, 1985.

RAJ, A. & KATZ, M. Beta-carotene as an inhibitor of benzo(a) pyrene and mitomycin C induced chromosomal breaks in the bone marrow of mice. Canadian Journal of Genetics and Cytology, 27: 598-602, 1985.

REDDY, B. Dietary fiber and colon carcinogenesis. A critical review. In Dietary Fiber in Health and Disease. VAHOUNY, D. & KRITCHEVSKY, D. eds. Plenum Press, New York, 1982. p.265-285.



REDDY,B.; EKELUND,G.; BOHE,M.; ENGLE,A.; DOMELLOF,L. Metabolic epidemiology of colon cancer: Dietary pattern and fecal sterol concentrations of three populations. Nutritional Cancer, 5: 34-40, 1983a.

REDDY,B.; MAEURA,Y.; WAYMAN,M. Effect of dietary corn bran and autohydrolyzed lignin on 3,2'-dimethyl-aminobiphenyl-induced intestinal carcinogenesis in rats. Journal National Cancer Institute, 71: 419-423. 1983b.

RENNER,H. Bioassay with antioxidant and beta-carotene as antimutagenic factors. In Genetic Toxicology of the Diet. KNUDSEN,I. ed. Alan R. Liss, Inc., New York, 1986. p.255-63.

ROUS,P. & KIDD,J. Conditional neoplasms and subthreshold neoplastic stages: a study of the tar tumors of rabbits. Journal of Experimental Medicine, 73: 365, 1941.

RUSSEL,L. & MAJOR,M. Radiation induced presumed somatic mutations in the house mouse. Genetics, 42: 161-175, 1957.

RUSSEL,W. X-Ray induced mutations in mice. Cold Spring Harbor Symposium Quantitative Biology, 16: 327-336, 1951.

SAKAMOTO-HOJO,E.; TAKAHASHI,C.; FERRARI,I.; MOTIDOME,M. Clastogenic effect of plant alkaloid ellipticine on bone marrow cells of wistar rats and on peripheral blood lymphocytes. Mutation Research, 199: 11-19, 1988.



SALONEN, J.; SALONEN, R.; LAPPETELAINEN, R.; MAENPAA, P.; ALTHAN, G.; PUSKA, P. Risk of cancer in relation to serum concentrations of selenium and vitamins A e B: matched case-control analysis of prospective data. British Medical Journal, 290: 417, 1985.

SALYSBURY, F. & ROSS, C. Plant Physiology. JENSEN, W. & KAVALIJAN, L. eds. Wadsworth Publishing Company, Inc., Belmont, California, 1969. 747p.

SCHAFFNER, R. Current regulations and future activities of the food and drug administration for regulating colors. In Current Aspects of Food Colorants. FURIA, T. ed. CRC Press, Inc., Cleveland, Ohio, 1977, p.85-90.

SCHEFLER, W. Statistics for the Biological Sciences. Addison-Wesley Publishing Company, California. 1969, p.231.

SCHENKMAN, J.; FAVREAU, L.; MOLE, J.; KREUTZER, D.; JANSSON, I. Fingerprinting rat liver microsomal cytochromes P-450 as a means of delineating sexually distinctive forms. Archives of Toxicology, 60: 43-51, 1987.

SCHENKMAN, J.; FREY, I.; REMMER, H.; ESTABROOK, R. Sex differences in drug metabolism by rat liver microsomes. Molecular Pharmacology, 3: 516-525, 1967.

SCHMID, W. The micronucleus test. Mutation Research, 31: 9-15, 1975.



SCHWARTZ,S.; VON ELBE,J.; PARIZA,M.; GOLDSWORTHY,T.; PITOT,H.

Inability of red beet betalain pigments to initiate or promote hepatocarcinogenesis. Food Chemistry Toxicology, 21: 531-536, 1983.

SEITZ,H.; GARRO,A.; LIEBER,C. Effect of chronic ethanol ingestion on intestinal metabolism and mutagenicity of benzo(a) pyrene. Biochemical and Biophysical Research Communications, 85: 1061-1066, 1978.

SHAMBERGER,R. Relationship of selenium to cancer. 1. Inhibition effect of selenium on carcinogenesis. Journal of the National Cancer Institute, 44: 331-336, 1970.

SHAMBERGER,R. & WILLIS,C. Selenium distribution and human cancer mortality. Clinical Laboratory Science, 2: 211-221, 1971.

SHIMOI,K.; NAKAMURA,I.; TOMITA,I.; KADA,T. Bio-antimutagenic effects of tannic acid on UV and chemical induced mutagenesis in Escherichia coli B/r. Mutation Research, 149:17-23, 1985.

SINGER,B. & GRUNBERGER,D. Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens. Plenum Press, New York. 347p. 1983.

SLATER,T.; CHEESEMAN,K.; DAVIES,M.; PROUDFOOT,K.; XIN,W. Free radical mechanisms in relation to tissue injury. Symposium on "Nutritional aspects of free radical". Proceedings of the Nutritional Society, 46: 1-12, 1987.



SMITH,L. & CULVENOR,C. Plant sources of hepatotoxic pyrrolizidine alkaloids. Journal of Natural Products, 44: 129-52, 1981.

SOKAL,R. & ROHLF,J. Biometry. The Principles and Practices of Statistics in Biological Research. Freeman and Company, 1969, 776p.

SOMOGYI,J. Naturally occurring toxicants in food. Bibliotheca Nutritio et Dieta, 29: 110-127, 1980.

SPARNINS,V.; CHUAN,J.; WATTENBERG,L. Enhancement of glutathione 5-transferase activity of the esophagus by phenols, lactones and benzyl-isothiocyanate. Cancer Research, 42: 1205-1207, 1982.

STICH,H.; ROSIN,M.; WU,C.; POWRIE,W. The use of mutagenicity testing to evaluate food products. In Mutagenicity: new horizons in genetic toxicology. HEDDLE,J. ed. Academic Press, New York, 1982. p.117-139.

SUGIMURA,T.; NAGAO,M.; KAWACHI,T.; HONDA,M.; YAHAGI,T.; SEINO,Y.; SATO,S.; MATSUKURA,N.; MATSUSHIMA,T.; SHIRAI,A.; SAWAMURA,M.; MATSUMOTTO,H. Mutagen-carcinogen in food, with special reference to highly mutagenic pyrolytic products in broiled foods. In Origins of Human Cancer. BOOK,C.; HIATT,H.; WATSON,J. & WINSTEN,J. eds. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1977. p.1561-1576.



SWAIN,T. Secondary compounds as protective agents. Annual Review of Plant Physiology, 28: 479-501, 1977.

TANNENBAUN,S., ARCHER,M., WISHNOK,J., CORREA,P.; CUELLO,C.; HAENSZEL,W. Nitrate and the etiology of gastric cancer. In Origins of Human Cancer, Book C. Human Risk Assessment. HIATT,H.; WATSON,J. & WINSTEN,J. eds Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nova York. 1977. p.1609-1625.

TANNENBAUM,S.; FETT,D.; YOUNG,V.; LAND,P.; BRUCER,R. Nitrite and nitrate are formed by endogenous synthesis in the human intestine. Science, 200: 1487-1488, 1978.

TANNENBAUM,S.; SINSKEY,A.; WEISMAN,M.; BISHOP,N. Nitrite in human saliva. Its possible relationship to nitrosamine formation. Journal National Cancer Institute, 53: 79-84, 1974.

TAYLOR,R. Food Additives. John Wiley & Sons. Chichester, New York, Toronto. 1980. 126p.

TICE,R. & IVETT,J. Cytogenetic analysis of bone marrow damage. In Toxicology of the Blood and Bone Marrow. IRONS,R. ed. Raven Press, New York, 1985. p.119-140.

TU,Y. & YANG,C. Demethylation and denitrosation of nitrosamines by cytochrome P-450 isozymes. Archives of Biochemistry and Biophysics, 242: 32-40, 1985.



- TURNER, W. Fungal metabolites. Academic Press, London, 446p. 1971.
- VIRTANEN, A. Some organic sulfur compounds in vegetables and fodder plants and their significances in human nutrition. Angewandte Chemie International Edition. 1: 299-306, 1962.
- VIULLAUME, M. Reduced oxygen species, mutation, induction and cancer initiation. Mutation Research, 186: 43-72, 1987.
- VON ELBE, J. Status of colors in the dairy industry. Dairy Ice Cream Field, 161: 160, 1977a.
- VON ELBE, J. The betalaines. In Current Aspects of Food Colorants. FURIA, T. ed.- CRC Press, Cleveland, Ohio, 1977b. p.29-39.
- VON ELBE, J. & MAING, I. Betalain as possible food colorants of meat substitutes. Cereal Science Today, 18: 263-66, 1973.
- VON ELBE, J.; KLEMENT, J.; AMUNDSON, C.; CASSENS, R.; LINDSAY, R. Evaluation of betalain pigments as sausage colorants. Journal Food Science, 39: 128-132, 1974a.
- VON ELBE, J.; MAING, I.; AMUNDSON, C. Color stability of betanine. Journal Food Science, 39: 34, 1974b.
- VON ELBE, J.; SY, S.; MAING, I.; GABELMAN, W. Quantitative analysis of betacyanins in red table beets (*Beta vulgaris*). Journal Food Science, 37: 932, 1972.



WASSERMAN, A. & TALLEY, F. The effect of sodium nitrite on the flavor of frankfurters. Journal of Food Science, 37: 536, 1972.

WATTENBERG, L. Inhibition of carcinogenic effects of polycyclic hydrocarbons by benzyl isothiocyanate and related compounds. Journal of National Cancer Institute, 58: 395-398, 1977.

WATTENBERG, L. & LOUB, W. Inhibition of polycyclic hydrocarbon-induced neoplasia by naturally-occurring indoles. Cancer Research, 38: 1410-1413, 1978.

WATTENBERG, L.; COCCIA, J.; LAM, L. Inhibitory effect of phenolic compounds on benzo(a) pyrene-induced neoplasia. Cancer Research, 40: 2820-2823, 1980.

WOLFF, T.; DISTLERATH, L.; WORTHINGTON, M.; GUENGERICH, P. Human liver debrisoquine 4-hydroxylase: test for specificity toward various monooxygenase substrates and model of the active site. Archives of Toxicology, 60: 89-90, 1987.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Expert committee on the prevention of cancer. WHO Technical Report Series, 276, Geneva. 1964.

WRIGHT, A. The role of metabolism in chemical mutagenesis and chemical carcinogenesis. Mutation Research, 75: 215-241, 1980.

WYLER, H. & DREIDING, A. Phytolaccanin, der Fargestoff der kermesbeere (Phytolacca decandra L.). Helvetica Chimica Acta, 44: 249, 1961.



