

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE DO CAPSIATE  
(*Capsicum annum*) E RESVERATROL SUPLEMENTADOS  
EM RATOS WISTAR ATRAVÉS DO TESTE DE  
MICRONÚCLEO**

**FRANCIJANE FERREIRA PAIXÃO**

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE DO CAPSIATE  
(*Capsicum annum*) E RESVERATROL SUPLEMENTADOS  
EM RATOS WISTAR ATRAVÉS DO TESTE DE  
MICRONÚCLEO**

**FRANCIJANE FERREIRA PAIXÃO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, como parte dos requisitos pra obtenção do título de mestre em Ciência Animal – Área de concentração: Fisiopatologia animal.

Orientadora:  
Profa. Dra. Rosa Maria Barilli Nogueira.

636.089  
P383a

Paixão, Francijane Ferreira  
Avaliação da genotoxicidade do capsiate  
(*Capsicum annum*) e resveratrol suplementados em  
ratos wistar através do teste de micronúcleo /  
Francijane Ferreira Paixão. – Presidente Prudente,  
2014.  
45 f. : il.

Dissertação (Mestrado em Ciência Animal) --  
Universidade do Oeste Paulista, Unoeste,  
Presidente Prudente, SP, 2014.

Bibliografia.

Orientador: Rosa Maria Barilli Nogueira.

1.Capsiate. 2.Resveratrol. 3. Micronúcleo.  
4.Genotóxico. I.Título.

**FRANCIJANE FERREIRA PAIXÃO**

**AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE DO CAPSIATE  
(*Capsicum annum*) E RESVERATROL SUPLEMENTADOS  
EM RATOS WISTAR ATRAVÉS DO TESTE DE  
MICRONÚCLEO**

Dissertação apresentada a Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Universidade do Oeste Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciência Animal.

Presidente Prudente, 27 de Março de 2014.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Profª Drª Rosa Maria Barilli Nogueira  
Universidade do Oeste Paulista –  
Unoeste Presidente Prudente – SP

---

Profª Drª Alessandra Melchert  
Universidade Estadual Paulista –UNESP  
Botucatu– SP

---

Profª Drª. Cecília Braga Laposy  
Universidade do Oeste Paulista –  
Unoeste Presidente Prudente – SP

## DEDICATÓRIA

À Deus por sempre me conceder sabedoria nas escolhas dos melhores caminhos, coragem para acreditar, força para não desistir e proteção para me amparar.

À minha família, em especial meus queridos pais José e Sueli, que tanto ouviu, tanto ajudou, muitas vezes sem nem entender o real motivo dos meus lamentos!  
Obrigada por acreditar no meu trabalho e na minha profissão.

Aqueles que tiveram muito próximo de mim durante todo período de estudo, em especial a minha irmã por todo amor e carinho e pelo meu companheiro Éverton por toda compreensão e apoio.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente à Deus que me fez instrumento de vossa fé, senhor de todas as coisas, me livrando de todo o mal, me guiando e me abençoando a cada passo, me fazendo acreditar que com ele tudo é possível, basta seguir seus ensinamentos.

A Universidade do Oeste paulista e a todos os professores do Programa de mestrado de Ciência animal pelos conhecimentos transmitidos.

A minha professora orientadora, Rosa Maria Barilli Nogueira, por acreditar no futuro deste projeto, por toda confiança em mim e orientação, pelo exemplo de ser humano e profissional a ser seguido, não tenho palavras para expressar um enorme sentimento de gratidão e admiração. Tenho orgulho em dizer que fui sua orientada.

A professora Alessandra Melchert pela oportunidade em iniciar o mestrado sem me conhecer direito, você abriu as portas, acreditar no meu potencial, pela amizade, respeito e orientação e sua disponibilidade na participação da banca.

As professoras Cecília Braga Laposy e Sílvia Franco Andrade, pelo apoio carinho e dedicação em todos os momentos

Ao professor Rogério Giuffrida pela importante contribuição nas análises estatísticas.

A faculdade de medicina de presidente Prudente e a coordenadora Dr. Luciana Kely Camargos por todo apoio e compreensão concedido.

A minha amiga e parceira de trabalho Miriam Sales por me ouvir sempre, principalmente nos momentos de lamentações, por me auxiliar nas minhas ausências, por todo apoio, cumplicidade, carinho e amizade.

Aos meus amados pais por todos ensinamentos morais, educação, confiança, e eterna dedicação, e principalmente amor incondicional para que eu pudesse conduzir minha vida da melhor maneira possível e realizar feitos como este.

Ao meu noivo e amigo Éverton Padilha, pelo apoio incondicional em todos os momentos da execução deste trabalho, por toda sua compreensão principalmente nas minhas ausências pelo carinho, amor e respeito.

As minhas queridas amigas pela amizade e que entenderam o quanto foi importante pra mim esse desafio, cada qual à sua maneira, tem uma participação importante na realização deste trabalho.

## RESUMO

### **Avaliação da genotoxicidade do capsiate (*Capsicum annuum*) e resveratrol suplementados em ratos wistar através do teste de micronúcleo**

Este estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos da suplementação com o capsiate, extraído da pimenta *Capsicum annuum* (pimenta doce), e do composto fenólico resveratrol, extraído de uvas, em ratos Wistar através do teste de micronúcleo em medula óssea. Sessenta e quatro ratos machos, adultos de linhagem Wistar, foram distribuídos em quatro grupos (n=16) e suplementados com: grupo controle negativo (GCN)- 0,5ml de solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo controle positivo (GCP)- 50mg/kg de ciclofosfamida; grupo capsiate (GC)- 10mg/kg de capsiate diluído em 0,5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo resveratrol (GR)- 30mg/kg de resveratrol diluído em 0,5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. Somente o GCP recebeu a administração por via intraperitoneal. Os demais grupos foram suplementados por gavagem uma vez ao dia, durante seis semanas. Ao final das seis semanas os animais foram anestesiados, sacrificados e realizado o teste de micronúcleo em medula óssea. A frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos do GCN, GCP, GC e GR foram, respectivamente,  $2,5 \pm 0,53$ ,  $5,7 \pm 1,03$ ,  $2,5 \pm 0,73$  e  $2 \pm 0,73$  em mil células. Na comparação entre os grupos observou-se diferença estatística significativa somente do GCP em relação aos demais grupos. Conclui-se que a suplementação de capsiate na dose de 10mg/Kg e resveratrol na dose de 30mg/Kg, em frequência diária, durante 06 semana, não produziu genotoxicidade em ratos Wistar.

Palavras-Chave: Capsiate. Resveratrol. Micronúcleo. Genotóxico.

## ABSTRACT

### **Evaluation of the genotoxicity capsiate (*Capsicum annum*) and supplemented resveratrol in Wistar rats by the micronucleus test**

This study aimed to evaluate the possible genotoxic effects of supplementation with capsiate extracted Pepper *Capsicum annum* (sweet pepper), and the phenolic compound resveratrol extracted from grapes in Wistar rats by the micronucleus test in bone marrow. Sixty-four male rats, adult Wistar were divided into four groups (n = 16) and supplemented with: negative control group (GCN) - 0.5 ml of sodium chloride 0.9%; positive control group (GCP) - 50mg/kg cyclophosphamide; capsiate group (CG) - capsiate 10mg/kg diluted in 0.5 mL of 0.9% sodium chloride; resveratrol group (GR) - resveratrol 30mg/kg diluted in 0.5 mL of 0.9% sodium chloride. Only the PCM received intraperitoneal administration. The other groups were supplemented by gavage once a day for six weeks. At the end of six weeks the animals were anesthetized, sacrificed and the micronucleus test performed in bone marrow. The frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes of the BCM, PCM, GC and GR were 2.5, respectively,  $\pm 0.53$ ,  $5.7 \pm 1.03$ ,  $2.5 \pm 0.73$  and  $2 \pm 0.73$  in a thousand cells. When comparing both groups there was statistically significant difference only GCP compared to other groups. It is concluded that supplementation at a dose of 10mg/kg capsiate and resveratrol at a dose of 30mg/Kg in daily frequency for 06 weeks did not produce genotoxicity in Wistar rats.

Keyword: Capsiate. Resveratrol. Micronucleus. Genotoxic.



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	09
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	11
2.1 Alimentos funcionais.....	11
2.2 Capsiate.....	12
2.3 Resveratrol.....	14
2.4 Genotoxicidade .....	17
2.4.1 Testes para detecção de mutagênese.....	18
2.4.2 Teste do Micronúcleo .....	19
REFERÊNCIAS.....	22
ARTIGO CIENTÍFICO.....	28
ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO.....	38

## 1 INTRODUÇÃO

A população mundial vem demonstrando crescente preocupação com a alimentação e seus constituintes, o que incentiva a indústria de alimentos a investir em produtos saudáveis e alimentos funcionais (SOUZA; SOUZA NETO; MAIA, 2003; MARQUES et al., 2011). O crescente mercado dos produtos naturais, aliado ao interesse dos consumidores na prevenção de doenças, tem pressionado a indústria alimentícia na busca por produtos mais saudáveis, direcionando assim pesquisas neste seguimento. Neste contexto, os alimentos e suplementos funcionais ganharam prestígio pelos efeitos benéficos que promovem à saúde e, entre esses, destacam-se os capsinóides, provenientes das pimentas (DUTRA, et al., 2010), e o resveratrol proveniente das uvas (BACHUR et al., 2009).

Sabe-se que as pimentas e seus princípios, tais como o capsiate, proveniente das pimentas doces, são capazes de prevenir doenças como o câncer (LUO; PENG; YUAN-JIAN, 2011), apresentam propriedades cicatrizante, antioxidantes, bactericida, antitrombótica, antiaterosclerótica, hipocolesterolemiantes, anti-hemorragica, mucolítica, expectorante e descongestionante, influenciam na liberação de endorfinas, funcionando como analgésico natural, além de serem indutoras da termogênese, aumentando o gasto calórico (LOPES; OKURA, 2008; BONTEMPO, 2007; DUTRA et al., 2010).

A suplementação dietética com resveratrol exerce efeitos protetores contra as doenças cardiovasculares, onde foram descritos resultados de prevenção dos danos causados pelo estresse oxidativo, diminui os lipídeos plasmáticos com inibição da formação de placas de ateroma, tem efeito de proteção do endotélio vascular por aumento na liberação de óxido nítrico e diminui a produção de radicais livres (BACHUR et al., 2009).

Entretanto, apesar dos benefícios relatados de certos alimentos e seus derivados, existe grande preocupação no que diz respeito ao potencial mutagênico e genotóxico dos mesmos. Esta preocupação tem origem no fato destas substâncias originarem metabólitos com capacidade de alquilar material genético e induzir alguns tipos de câncer (MONSEREENUSORN, 1983; OLAJOS; SALEM, 2001; ROCHA et al., 2009).

Em vista ao crescente uso destas substâncias com diferentes propriedades terapêuticas, na tentativa de promover a saúde através dos seus benefícios, testes de toxicidade pré-clínica são imprescindíveis.

Desta forma, este estudo teve como objetivo avaliar os possíveis efeitos genotóxicos da suplementação com o capsiate, extraído da pimenta *Capsicum annuum* (pimenta doce), e do composto *fenólico resveratrol*, extraído de uvas, em ratos Wistar.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Alimentos funcionais

Nos últimos anos o número de alimentos que possuem benefícios potenciais para a saúde tem apresentado elevado crescimento. Pesquisas recentes confirmam a presença de ingredientes específicos nos alimentos que apresentam importantes atividades biológicas no organismo, além do aspecto nutricional, esses alimentos são chamados de funcionais (BLENFORD, 1994).

Alimentos funcionais são definidos pelo International Food Information Council (IFIC) como alimentos que provêm benefícios adicionais à saúde, atribuídos aos nutrientes que contêm (LAMARÃO; FIALHO, 2009). São alimentos que, além de fornecerem os nutrientes básicos (carboidratos, proteínas, lipídios, vitaminas, minerais, fibras e água) e cumprirem suas funções nutricionais, promovem a saúde por possuírem determinadas substâncias capazes, através de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, de promover a saúde, no entanto seu papel potencialmente benéfico para a prevenção e tratamento de doenças deve ser investigado por dois aspectos, primeiramente como uma pesquisa de fármacos com potencial terapêutico, e em segundo como medida de segurança para uso popular (BASHO; BIN, 2010).

As substâncias dos alimentos funcionais atuam modulando a fisiologia do organismo e ativando os processos metabólicos, melhorando, garantindo e mantendo as condições de saúde do organismo. É capaz de promover efeito hipocolesterolemiantes, hipotensivos, reduzindo os riscos de aterosclerose, efeitos anticancerígenos, hipoglicêmicos, entre outros, pelo aumento e estimulação da efetividade do sistema imune, promovendo o bem-estar das pessoas e prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade (THAMER; PENNA, 2006).

A procura por esses alimentos tem estimulado a descoberta de novos componentes naturais, bem como a fabricação de novos produtos que contêm compostos funcionais bioativos; incluindo fibra dietética, oligossacarídeos,

açúcares alcóois, peptídeos e proteínas, prebióticos e probióticos, fitoquímicos, antioxidantes, ácidos graxos poliinsaturados, minerais e outras substâncias que referem propriedades funcionais ou efeitos benéficos de prevenção à saúde do homem (SGARBIERI, 2000; BURITI, 2005; THAMER; PENNA, 2006; KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Dentre os alimentos funcionais provenientes de fonte vegetal que reduz o risco de doenças crônicas, particularmente o câncer e que provem a saúde do indivíduo, destacam-se o alho, tomate, cebola, repolho, couve-flor, brócolis, chá verde ou preto, soja, aveia, frutas cítricas e sementes de linhaça (SGARBIERI, 2002). Os ingredientes responsáveis pela funcionalidade desses produtos são liderados pelas fibras dietéticas, óleos de peixe, esteróis de plantas, minerais, vitaminas, prebióticos e probióticos (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

Recentemente foi descoberto que as pimentas, além dos seus nutrientes, possuem componentes que promovem e preservam a saúde (ZANCANARO, 2008) e o resveratrol tem demonstrado benefícios cardiovasculares, uma vez que apresentam propriedades hipolipemiantes reduzindo a produção de radicais livres e conseqüentemente o estresse oxidativo (BACHUR et al., 2009).

Na produção de um novo fármaco, os resultados de testes tóxicos apresentam considerável peso, uma vez que as indústrias farmacêuticas liberam o processamento de um novo agente terapêutico com base nos resultados de testes de genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* (PUERVES et al., 1995).

## 2.2 Capsiate

O nome pimenta vem do latim *pigmentum*, (“matéria corante”) que no espanhol virou “*pimienta*” (ZANCANARO, 2008). As pimentas pertencem à família *Solanaceae* e ao gênero *Capsicum* e são representadas pelas pimentas e pimentões, onde a origem do nome *Capsicum* parece estar ligada à derivação da palavra grega *kapto*, cujo significado é “picar” e *kapsakes* que significa “cápsula” (NUEZ, 1995). As pimentas (*Capsicum spp.*) compõem uma importante parte do mercado de hortaliças frescas do Brasil, e também do segmento de condimentos, temperos e conservas (DUTRA et al., 2010).

Atualmente constam mais de 150 variedades de *Capsicum* catalogadas no mundo (ZANCANARO, 2008), divididas em cerca de 20 a 25 espécies, todas derivadas de 5 espécies cultivadas: *Capsicum annuum*, *Capsicum baccatum*, *Capsicum chinese*, *Capsicum frutescens* e *Capsicum pubescens* (BONTEMPO, 2007; DUTRA et al, 2010).

O estudo das pimentas do gênero *Capsicum* vem de longa data, e não se limitaram à agronomia, pois as pimentas devem ser encaradas como alimentos especiais, e não somente como temperos de uso culinário ou como elemento botânico (STARK, 2008).

As pimentas vermelhas são a principal fonte de capsaicinóides, que consistem de capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, entre outros (LUO; PENG; YUAN-JIAN, 2011). A capsaicina, acumulada pelas plantas é liberada pelo dano físico às células quando se extraem sementes ou corta-se o fruto para qualquer fim, é o componente ativo das pimentas vermelha tipo chilli, conferindo a estas o sabor picante ou princípio pungente (TSI et al, 2003; DUTRA et al., 2010).

A capsaicina dá a sensação de calor devido aos seus componentes químicos, capazes de estimular as papilas gustativas da boca (ZANCANARO, 2008), fazendo com que as pimentas sejam consideradas estimulantes do apetite e auxiliares da digestão, pois o consumo desse aditivo aumenta a salivação, estimula a secreção gástrica e a motilidade gastrointestinal, proporcionando uma sensação de bem-estar (CARDOSO et al., 2010).

Os capsaicinóides podem exercer múltiplos efeitos farmacológicos e fisiológicos, incluindo atividade analgésica (liberação de endorfinas), anti-inflamatória, antioxidante, apresenta valor potencial para alívio da dor, prevenção do câncer e perda de peso (induz a termogênese aumentando o gasto calórico), propriedades cicatrizantes, bactericida, previne a arteriosclerose, controla o colesterol, evita hemorragias, faz dissolução de muco dos pulmões é expectorante e descongestionante (LOPES; OKURA, 2008; BONTEMPO, 2007; DUTRA et al., 2010; LUO; PENG; YUAN-JIAN, 2011).

A ingestão concomitante de pimenta e cafeína produziu diminuição de apetite, e consumo de lipídios em mulheres, e em homens diminuição no consumo calórico acompanhada de aumento do gasto calórico, indicando uma

mudança considerável no balanço energético (YOSHIOKA et al., 1995; STARK, 2008). Estudos em animais demonstraram que a capsaicina estimula a atividade do sistema nervoso simpático promovendo aumento na mobilização de lipídios e diminuição de tecido adiposo (KAWADA et al, 1986). “Em ratos alimentados com dieta hiperlipídica e com pequenas quantidades de pimenta vermelha (*Capsicum annuum*) observou-se efeito hipocolesterolêmico e hipotrigliceridêmico, reduzindo o risco de desenvolvimento de aterosclerose (STARK, 2008).

A capsaicina tem demonstrado que afeta o metabolismo lipídico, porém, de momento não é conhecido se a capsaicina diminuiria a absorção intestinal de colesterol. Em ratos infundidos com emulsão lipídica e posteriormente infundidos ou não com capsaicina, verificou-se absorção linfática de colesterol reduzida naqueles tratados com capsaicina (SEO; KIM; NOH, 2009).

Entretanto, o uso da capsaicina a longo prazo pode ser limitado devido à sua elevada pungência, sendo alternativa o uso da pimenta doce, um cultivar não pungente da pimenta vermelha extraídos da *Capsicum annuum* L-CH-19 Sweet, onde apresentam estrutura semelhante à dos capsaicinóides chamado também de capsiate, composto análogo à capsaicina (OHNUKI et al., 2001; LUO; PENG; YUAN-JIAN, 2011).

### **2.3 Resveratrol**

O resveratrol é uma fitoalexina produzido por diversas plantas como Kojo-kon (*Polygonum cuspidatum*), Kashuwu (*Polygonum multiflorum*), eucalipto, amendoim, amora, frutos do bosque e também está presente em uvas (*Vitis vinifera* e *Vitis labrusca*) (KING; BOMSER; MIN, 2006; WU et al., 2001;). É sintetizado naturalmente na planta e apresentado quimicamente sob duas formas isômeras: transresveratrol (trans-3,5,4'-trihidroxiestilbeno) e cisresveratrol (cis-3,5,4'-trihidroxiestilbeno). O isômero transresveratrol é convertido para cisresveratrol em presença da luz, pois esta forma é mais estável (LIMA et al., 1999; KING; BOMSER; MIN, 2006). A estrutura molecular do resveratrol é similar ao dietilestibestrol, que é o estrogênio sintético. Assim sendo, tem propriedades farmacológicas similares às do estradiol, principal estrogênio natural humano (BRADAMANTE; BARRENGHI; VILLA, 2004; RATNA; SIMONELLI, 2002).

O resveratrol é um composto polifenólico encontrado principalmente em uvas frescas, suco de uva e vinho (WU et al., 2001). O resveratrol é produzido pela pele das uvas em resposta à exposição fúngica. Na uva esta fitoalexina é sintetizada na casca como resposta ao stress causado por ataque fúngico (*Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*), dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta. Por existir na casca da uva, o resveratrol é extraído para o vinho durante a maceração necessária à sua produção. Assim, ele tem sido detectado em diversos tipos de vinhos, oriundos de várias regiões do mundo (LIMA et al., 1999). Segundo Turner (1999), o resveratrol tem sido usado em muitos estudos, como um mediador da proteção cardiovascular independente de álcool que seria conferida pela ingestão de vinho tinto. Segundo Athar et al. (2007) o resveratrol parece não apresentar toxicidade nas doses testadas entre 50 mg/Kg a 1000 mg/kg.

O resveratrol protege o sistema cardiovascular por uma série de mecanismos, incluindo: a inibição da oxidação de baixa densidade da lipoproteína mediada pelo resveratrol; a inibição da agregação plaquetária; a síntese de pró-aterogênicos; a inibição da proliferação celular, inibindo também a síntese de tromboxinas, portanto atuando como anticoagulante (PENDURTHI; RAO, 2002, PACE-ASCIK et al., 1995).

Diversos estudos atribuem ainda ao resveratrol propriedades antiinflamatórias, devido à redução da produção de moléculas de adesão e citocinas (CSISZAR et al., 2006), bem como inibição da produção de várias citocinas pró-inflamatórias pelos macrófagos, nomeadamente IL-2, TNF- $\alpha$  e IL-12 (SUBBARAMAIAH et al., 1998; BOSCOLO et al., 2003).

O resveratrol apresenta ainda atividade antioxidante direta, que se deve essencialmente à sua capacidade em quelar o cobre e atividade captadora de radicais livres (FREMONT; BELGUENDOUZ; DELPAL, 1999). Adicionalmente, apresenta ação antioxidante indireta, devido aos seus efeitos em diferentes sistemas enzimáticos e antioxidantes celulares, que no seu conjunto melhoram o estado redox da célula (CAVALLARO et al., 2003; CAO; LI, 2004).

Estudos em animais demonstraram que o resveratrol afeta o metabolismo lipídico, diminui a concentração intracelular de ésteres de colesterol assim como a capacidade de secreção de triacilgliceróis, apesar dos seus níveis



intracelulares se manterem inalterados (ARICHI et al., 1982; PAL et al., 2003). Desta forma, teria a capacidade de diminuir a produção de colesterol VLDL e conseqüentemente aumentar o colesterol LDL. No entanto, os resultados obtidos em modelos animais são contraditórios. O resveratrol não reduziu o colesterol plasmático com dietas enriquecidas em colesterol, assim como não alterou a proporção de colesterol associado à concentração de lipoproteínas de alta e baixa densidade em ratas (TURRENS; LARICCIA; NAIR, 1997). Por outro lado, outro estudo relata que o resveratrol diminui os níveis séricos de triacilgliceróis e colesterol VLDL (MIURA; MIURA; YAGASAKI, 2003; GIEHL et al., 2007).

O resveratrol atua também sobre o câncer de diversas maneiras, nos três estágios distintos de carcinogênese (iniciação, promoção e progressão) por vias de transdução de sinal de modulação que controlam a divisão celular e crescimento, apoptose, inflamação, angiogênese e metástase. Uma destas é a inibição da cascata do ácido araquidônico, esta rota metabólica pode induzir a gênese de tumores, outra é pela inibição da proteína Cquinase, um mediador chave na promoção dos tumores (STEWART; CHRISTMAN; O'BRIAN, 2000). Estudos indicam que o resveratrol pode induzir a morte programada de células, ou seja, a apoptose, atuando em alguns tipos de tumores como um agente antiproliferativo (SCHNEIDER et al., 2000; ATHAR et al., 2007).

Jang et al. (1997) demonstraram que o uso de resveratrol no câncer de pele induzido em ratos alopecicos inibiu significativamente o tumor. Já com a aplicação tópica de resveratrol, Soleas et. al.(2002), encontraram redução de 60% em papilomas, a qual os autores pensaram estar relacionados com a sua citotoxicidade e o seu potencial antioxidante.

## 2.4 Genotoxicidade

O aparecimento de mutações ocorre em todos os seres vivos, sendo um processo fundamental para a evolução e diversidade das espécies. Entretanto, podem trazer uma série de problemas, resultando na maioria das vezes, em alterações maléficas, tais como malformação, câncer, envelhecimento e morte (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Os organismos vivos estão freqüentemente expostos a substâncias mutagênicas que podem causar danos celulares. Os danos podem ser induzidos por agentes químicos, físicos ou biológicos que afetam processos vitais como a duplicação e a transcrição gênica, bem como alterações cromossômicas, levando a processos cancerosos e morte celular. Estas substâncias são conhecidas como genotóxicas por causarem lesões do material genético (BAGATINI; SILVA; TEDESCO, 2007).

A genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos que alteram a base da vida, em sua estrutura físico-química, o DNA, processo classificado como mutagênese. Os agentes que mudam a seqüência do DNA são “tóxicos” para o gene e são, então, chamados de genotóxicos. A palavra mutação pode ser definida como sendo qualquer alteração permanente no DNA, que leva a uma alteração herdável da função gênica (SILVA; ERDTMANN; HENRIQUES, 2003).

Assim, as mutações são mudanças na seqüência dos nucleotídeos do material genético de um organismo, podem ser causadas por erros de cópia do material durante a divisão celular, por exposição à radiação ultravioleta ou ionizante, agentes químicos ou vírus (DEARFIELD et al., 2002; LOPES; OKURA, 2008).

A mutação e a cancerização estão estreitamente associadas, uma vez que ambas representam alterações abruptas em uma única célula, são permanentes e herdadas pela células filhas (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE NETO, 1991). O câncer pode ser resultante de uma alteração na seqüência do DNA da célula ou mudança no padrão da expressão gênica. Ele não é resultado de uma única mutação em uma célula mais sim da ocorrência de

vários eventos independentes com efeitos cumulativos (FENECH, 1997; FENECH et al., 1999).

Substâncias mutagênicas têm sido utilizadas em testes de genotoxicidade como controles positivos. Alguns exemplos de controle positivos recomendados e suas respectivas doses são o etil-metanosulfonato 200 mg/Kg, N-etil-n-nitrosourea 50 m/kg, ciclofosfamida 50 mg/kg e mitomicina C 1 mg/kg (RIBEIRO, 2003).

Pela freqüência com que os agentes carcinogênicos fazem parte do nosso dia a dia e por seus efeitos prejudiciais em nosso material genético, novas pesquisas sobre genotoxicidade e antígenotoxicidade poderiam vir a corroborar na avaliação da efetividade de algumas substâncias anticarcinogênicas, incluindo a grande variedade encontrada em plantas usadas na medicina popular. Contudo, os mecanismos específicos propriamente ditos da ação de anticarcinógenos ainda encontram-se obscuros (PAOLINE; NESTLÉ, 2003).

#### **2.4.1 Testes para detecção de mutagênese**

Os testes atuam em um sistema experimental, divididos em quatro níveis onde o primeiro nível engloba ensaios moleculares em bactéria (avaliação de mutação em gene bacteriano); segundo nível consiste em provas *in vitro* em células de cultivo (avaliação de aberrações cromossômicas); o terceiro nível compreende em análises *in vivo* (avaliação de mutações gênicas em células de mamíferos) o quarto e último nível corresponde ao estudo em populações expostas a materiais genotóxicos (CRUZ; FREITAS, 2010).

Várias técnicas podem ser utilizadas para o teste, tais como:

1. Teste do Cometa: também chamado *Single Cell Gel Electrophoresis (SCGE)*, consiste em uma técnica simples e sensível para a detecção de danos primários no DNA que tem sido amplamente utilizada na genética toxicológica por ser um ótimo método capaz de detectar um amplo espectro de danos no DNA, ser adaptável a diversas espécies, sensível, rápido e de baixo custo (TICE et al., 2000). A técnica do cometa avalia os danos no DNA de células individuais causados pela substância testada. Nesse teste, é verificada a corrida de fragmentos de DNA em relação ao núcleo principal, quando este é

submetido a uma corrente em eletroforese, produzindo aspecto semelhante a um cometa (TICE et al., 2000).

2. Teste de Ames: (teste de mutagenicidade com *Salmonella typhimurum*), este teste permite a monitorização da ação direta sobre o material genético e a verificação da atividade positiva e ou negativa de metabólitos após biotransformação. A frequência de mutação é facilmente mediada pelo número de colônias que crescem (CRUZ; FREITAS, 2010).

3. Teste do micronúcleo (MN): tem sido aplicado em vários tipos de células e amplamente utilizado para avaliar o potencial mutagênico e genotóxico de diferentes produtos químicos e naturais e monitorar anomalias genéticas na população (FENECH, 2000). Neste teste, o efeito do agente químico é observado em eritrócitos policromáticos anucleados, que tem um tempo de vida relativamente curto, de modo que qualquer micronúcleo que ele contenha deve ter sido gerado como resultado de danos cromossômicos induzidos recentemente (RIBEIRO, 2003).

#### **2.4.2 Teste do Micronúcleo**

Dentre os métodos utilizados para avaliar a mutagenicidade de compostos *in vivo*, o teste do micronúcleo em células da medula óssea e sangue periférico de camundongos têm sido amplamente utilizado e aceito pelas agências reguladoras e comunidade científica para avaliação e o registros de novos produtos químicos e farmacêuticos que entram anualmente no mercado mundial (STOPPER; MULLER, 1997; CHOY, 2001; MAUTECA et al., 2006).

Segundo Fenech (2000), o teste de micronúcleo em células da medula óssea e sangue periférico é um dos mais bem estabelecidos testes, citogenéticos na área da genética toxicológica. Ambos detectam alterações genômicas e/ou danos no aparato mitótico, sendo os micronúcleos originados, indicativos de perdas irreversíveis de material genético (VALADARES; CASTRO; CUNHA, 2006).

O Teste do Micronúcleo foi desenvolvido por Schmid (1975), tendo sido melhorado alguns anos depois (SCHMID, 1975). O ensaio foi desenvolvido primeiramente em sistema-teste *in vivo*, em células de medula óssea de camundongos, e posteriormente teve a versão *in vitro*.

O Teste do Micronúcleo detecta substâncias mutagênicas que quebram os cromossomos (substâncias clastogênicas) ou que interferem na formação do fuso mitótico, alterando a distribuição equitativa dos cromossomos durante a divisão celular (FENECH, 2000; ARDEMA; KIRSCH-VOLDERS, 2001; RIBEIRO, 2003).

Os micronúcleos são formados de fragmentos cromossômicos ou cromatídicos acêntricos e de cromossomos que se atrasam, em relação aos demais, em sua migração para os pólos do fuso na anáfase, neste caso, são excluídos do novo núcleo formado na telófase. Estes micronúcleos são corpúsculos contendo DNA, sem qualquer conexão estrutural com o núcleo principal, podendo haver um ou mais por célula. É uma estrutura circular, menores de um terço do diâmetro do núcleo associado, semelhante na intensidade de coloração e microscopia no mesmo plano focal no núcleo associado (Figura 1) (FLORES; YAMAGUCHI, 2008). Sua freqüência aparece aumentada em tecidos expostos a agentes carcinogênicos bem antes de qualquer sintoma clínico (RIBEIRO, 2003).

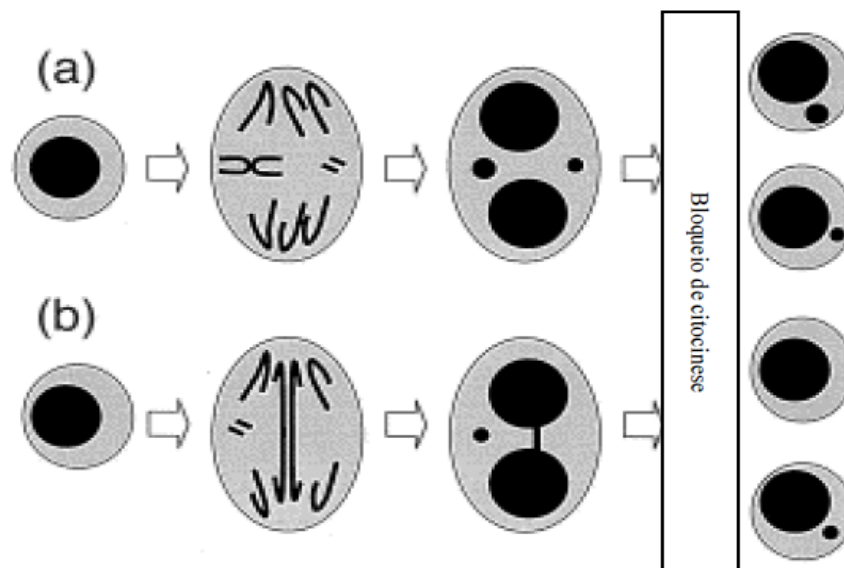


Figura 1 – Diagrama ilustrado a origem do micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico ou de um cromossomo inteiro (a); em (b), a formação de uma ponte citoplasmática e de um micronúcleo a partir de um fragmento cromossômico acêntrico

Fonte: (RIBEIRO, 2003).

O teste baseia-se num aumento da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados, utilizando para isso, preferencialmente, células de mamíferos, medula óssea ou sangue periférico, de animais devidamente tratados (FLORES; YAMAGUCHI, 2008).

Ribeiro (2003) relatam que na medula óssea, a célula tronco hematopoiética da origem a eritroblastos, esses sofrem uma duplicação final dos cromossomos, se dividem (ocorre a expulsão do núcleo) e se diferenciam em eritrócitos policromáticos, sendo que esse processo todo perdura de 10 a 12 horas. Na corrente sanguínea, os eritrócitos policromáticos se diferenciam em eritrócitos normocromáticos e, posteriormente, em eritrócitos, perdurando esse processo em 24 horas.

Ribeiro (2003) relatam que para os eritrócitos normocromáticos (NCEs) a frequência de células micronucleadas não aumenta da mesma forma que nos eritrócitos policromáticos (PCEs), e portanto não se faz necessário a sua análise. Considera-se uma frequência normal, 3 micronúcleos para 1000 PCEs (RABELLO-GAY; RODRIGUES; MONTELEONE NETO, 1991).

O teste de micronúcleo possui como vantagens a análise mais simples quando comparadas a outros testes, considerado um procedimento rápido, barato, que pode ser repetido várias vezes, para a prevenção e monitoramento de indivíduos sob risco carcinogênico, não necessitando, em alguns protocolos, do sacrifício do animal (HAYASHI et al., 1990), serve para diagnóstico de doenças e monitoramento ambiental tem alta sensibilidade e precisão (RIBEIRO, 2003; VILLELA et al., 2003).

## REFERÊNCIAS

- ATHAR, M. et al. Resveratrol: A review of preclinical studies for human cancer prevention. **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, v. 224, p. 274-283, 2007.
- ARDEMA, M. J.; KIRSCH-VOLDERS, M. The in vitro micronucleus assay. In: CHOY, W.N. (Ed.). **Genetic toxicology and cancer risk assessment**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 2001.
- ARICHI, H. et al. Effects of stilbene components of the roots of *Polygonum cuspidatum* Sieb. et Zucc. on lipid metabolism. **Chem. Pharm. Bull.**, v. 30, p. 1766-1770, 1982.
- BASHO, S. M.; BIN, M. C. Propriedades dos alimentos funcionais e seu papel na prevenção e controle da hipertensão e diabetes. **Interbio**, v. 4, n. 1, p. 48-58, 2010.
- BACHUR, C. K. et al. Suplementação dietética com resveratrol na promoção da saúde: uma revisão sistemática. **Rev. Bras. Nutr. Clin.**, v. 24, n. 1, p. 23-8, 2009.
- BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Rev. Bras. Farmacog.**, v. 17, n. 3, p. 444-47, 2007.
- BLENFORD, D. E. Food for better health. **Internacional Foods Ingredients**, United Kingdom, n. 3, p. 9-13, 1994.
- BONTEMPO, M. **Pimenta e seus benefícios à saúde**. São Paulo: Alaúde Editorial, 2007.
- BOSCOLO, P. et al. Effects of resveratrol on lymphocyte proliferation and cytokine release. **Ann. Clin. Lab. Sci.**, v. 33, p. 226-231, 2003.
- BRADAMANTE, S.; BARRENGHI L.; VILLA, A. Cardiovascular protective effects of resveratrol. **Cardiovasc. Drug Rev.**, v. 22, p. 169-88, 2004.
- BURITI, F. C. A. **Desenvolvimento de queijo fresco cremoso simbiótico**. 2005. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação Stricto Sensu em Tecnologia Bioquímica-Farmacêutica do Departamento de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo – SP.
- CAO, Z.; LI, Y. Potent induction of cellular antioxidants and phase 2 enzymes by resveratrol in cardiomyocytes: protection against oxidative and electrophilic injury. **Eur. J. Pharmacol.**, v. 489, p. 39-48, 2004.
- CARDOSO, J. et al. **Uso de alimentos termogênicos no tratamento da obesidade**. 2010. 18 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em

Nutrição) - Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro-Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.

CAVALLARO, A. et al. Effect of resveratrol on some activities of isolated and in whole blood human neutrophils. **Physiol. Res.**, v. 52, p. 555-562, 2003.

CHOY, W. N. (Ed.). **Genetic Toxicology and Cancer Risk Assessment**. 1. ed. New York: Marcel Dekker, 2001. Cap.: Regulatory genetic toxicology tests

CRUZ, A. B.; FREITAS, R. A. Toxicologia in vitro: principais modelos utilizados. SIMPÓSIO IBEROAMERICANO DE PLANTAS MEDICINAIS, 5, 2010, Itajaí.

Disponível em:

[http://www.vsipm.com.br/html/arquivos\\_menu2/cursos/Curso\\_7\\_2.pdf](http://www.vsipm.com.br/html/arquivos_menu2/cursos/Curso_7_2.pdf). Acesso em: 12 fev. 2013.

CSISZAR, A. et al. Resveratrol attenuates TNF-alpha-induced activation of coronary arterial endothelial cells: role of NF-kappaB inhibition. **Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.**, v. 291, p. 1694-1699, 2006.

LIMA, R. M. T. et al. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. **J. Agric. Food Chem.**, v. 47, p. 2666-2670, 1999.

DEARFIELD, K. L. et al. Genotoxicity risk assessment: a proposed classification strategy. **Mutat. Res.**, v. 521, p. 121-135, 2002.

DUTRA, F. L. A. et al. Avaliação sensorial e influência do tratamento térmico no teor de ácido ascórbico de sorvete de pimenta. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v. 4, n. 2, p. 243-251, 2010.

FENECH, M. The in vitro micronucleus technique. **Mutat. Res.**, v. 455, p. 81-95, 2000.

FENECH, M. The advantages and disadvantages of the cytokinesis-block micronucleus method. **Mutat. Res.**, v. 392, p. 11-18, 1997.

FENECH, M. et al. The Human Micronucleus Project: an international collaborative study on the use of the micronucleus technique for measuring DNA damage in humans. **Mutat. Res.**, v. 428, p. 271-283, 1999.

FLORES M., YAMAGUCHI M. U. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. **Revista Saúde e Pesquisa**, v. 1, n. 3, p. 337-340, 2008.

FREMONT, L.; BELGUENDOZ, L.; DELPAL, S. Antioxidant activity of resveratrol and alcohol-free wine polyphenols related to LDL oxidation and polyunsaturated fatty acids. **Life Sci.**, v. 64, p. 2511-2521, 1999.

GIEHL, M. R. et al. Eficácia dos flavonóides da uva, vinho tinto e suco de uva tinto na prevenção e no tratamento secundário da aterosclerose. **Scientia Medica**, v. 17, n. 3, p. 145-155, 2007.



JANG, J. J. et al. A 4-week feeding study of ground red chili (*Capsicum annuum*) in male B6C3F1 mice. **Food Chem. Toxicol.**, v. 30, p. 783-787, 1997.

KAWADA, T. et al. Capsaicin-induced beta-adrenergic action on energy metabolism in rats: influence of capsaicin on oxygen consumption, the respiratory quotient, and substrate utilization. **Proc. Soc. Exp. Biol. Med.**, v. 183, p. 250–256, 1986.

KING, R. E.; BOMSER, J. A.; MIN, D. B. Bioactivity of resveratrol. **Compr. Rev. Food Sci. Food Safety**, v. 5, p. 65-70, 2006.

KOMATSU, T. R., BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

HAYASHI, M. et al. The micronucleus assay with mouse peripheral reticulocytes using acridina orange-coated slides. **Mutat. Res.**, v. 245, p. 245-249, 1990.

LAMARÃO, R. C.; FIALHO, E. Aspectos funcionais das catequinas de chá verde no metabolismo celular e sua relação com a redução da gordura corporal. **Revista de Nutrição**, v. 22, n. 2, p. 257-269, 2009.

LOPES, E. V.; OKURA, M. H. Estudo de vida-de-prateleira e análise sensorial de conserva e molho da pimenta biquinho. **FAZU em Revista**, n. 2, p. 97-106, 2008.

LUO, X. J.; PENG, J.; YUAN-JIAN, L. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. **European Journal of Pharmacology**, v. 650, p. 1-7, 2011.

MARQUES, A. C. et al. Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) sob diferentes formas de prepare na resposta biológica em ratos. **Revista de Nutrição**, p. 131-141, 2011.

MAUTECA, R. et al. Chromosomal changes: induction, detection methods and applicability in human biomonitoring. **Biochimie**, v. 88, p. 515-531, 2006.

MIURA, D.; MIURA, Y.; YAGASAKI, K. Hypolipidemic action of dietary resveratrol, a phytoalexin in grapes and red wine, in hepatoma-bearing rats. **Life Sci.**, v. 73, p. 1393- 1400, 2003.

MONSEREENUSORN, Y. Subchronic toxicity studies of capsaicin and capsicum in rats. **Res. Comun. Chem. Pathol. Pharmacol.**, v. 41, p. 95–110, 1983.

NUEZ, F. **El cultivo de pimientos, chiles y ajies**. Madri: Ediciones Mundi-Prensa, 1995.

OHNUKI, K. et al. Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. **Biosci. Biotechnol. Biochem.**, v. 65, n. 21, p. 2735-2740, 2001.

OLAJOS, E. J.; SALEM, H. Riot control agents: pharmacology, toxicology, biochemistry and chemistry. **Journal of Applied Toxicology**, v. 21, n. 5, p. 355-391, 2001.

PACE-ASCIAK, C. R. et al. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. **Clin. Chim. Acta.**, v. 235, n. 2, p. 207-219, 1995.

PAL, S. et al. Red wine polyphenolics increase LDL receptor expression and activity and suppress the secretion of ApoB100 from human HepG2 cells. **J. Nutr.**, v. 133, p. 700-706, 2003.

PAOLINI, M.; NESTLE, M. Pitfalls of enzymes-based molecular anticancer dietary manipulations: food for thought. **Mutat. Res.**, v. 543, p.181-189. 2003.

PENDURTHI, U. S.; RAO, L. V. M. Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. **Thromb. Res.**, v. 106, n. 4, p. 243-8, 2002.

PUERVES, D. et al. Genotoxicity testing: current practices and strategies used by the pharmaceutical industry. **Mutagenesi**, v. 10, n. 4, p. 297-312, 1995.

RABELLO-GAY, M. N.; RODRIGUES, M. A. L. R.; MONTELEONE NETO, R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. **Revista Brasileira de Genética**, v. 1, p. 241-246, 1991.

RATNA, W. N.; SIMONELLI, J. A. The action of dietary phytochemicals quercetin, catechin, resveratrol and naringenin on estrogen-mediated gene expression. **Life Sci.**, v. 70, p. 1577-89, 2002.

RIBEIRO, R. L. Teste do micronúcleo em medula óssea de roedores in vivo. In: RIBEIRO, R. L.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. (Eds.). **Mutagênese ambiental**. 1. ed. Canoas: ULBRA, 2003. p.173-200.

ROCHA, K. K. H. R. et al. Resveratrol toxicity: effects on risk factors for atherosclerosis and hepatic oxidative stress in standard and high-fat diets. **Food Chem. Toxicol.**, v. 47, p. 1362-1367, 2009.

SEO, Y. J.; KIM, J. Y.; NOH, S. K. Effect of enteral capsaicin on the lymphatic absorption of cholesterol and fats in rats. **Journal of The Korean Society of Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 12, p. 1712-1717, 2009.

SCHMID, W. The micronucleus test. **Mut. Res.**, Amsterdam, v. 31, n. 1, p. 9-15, 1975.

SCHMITT, E. et al. Hormonal and genotoxic activity of resveratrol. **Toxicology Letters**, v. 136, n. 2, p. 133-142, 2002.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

SCHNEIDER, Y. et al. Anti-proliferative effect of resveratrol, a natural component of grapes and wine, on human colonic cancer cells. **Cancer Letters**, v. 158, p. 85-91, 2000.

SGARBIERI, V. Consciência de que doenças começam no útero materno, aumenta demanda por alimentos funcionais. **Jornal da Unicamp**, São Paulo, nov. 2002.

SOLEAS, G. J. et al. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. **Clin. Biochem.**, v. 35, p. 119-24, 2002.

STEWART, J. R.; CHRISTMAN, K. L.; O'BRIAN, C. A. Effects of resveratrol on the autophosphorylation of phorbol ester-responsive protein kinases: Inhibition of protein kinase D but not protein kinase C isozyme autophosphorylation. **Biochemical Pharmacology**, v. 60, n. 9, p. 1355-1359, 2000.

SUBBARAMAIAH, K. et al. Resveratrol inhibits ciclooxigenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. **Journal of Biological Chemistry**, v. 273, n. 34, p. 21875-21882, 1998.

SOUZA, P. H. M.; SOUZA NETO, M. H.; MAIA, G. A. Componentes funcionais nos alimentos. **Boletim da SBCTA**, v. 37, n. 2, p.127-135, 2003.

STARK, C. B. **Características e benefícios da capsaicina**. 2008. 39 f. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

STOPPER, H.; MULLER, S. O. Micronuclei as a biological endpoint for genotoxicity: a minireview. **Toxicology in Vitro**, v. 11, p. 661-667, 1997.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciênc. Tecnol. Aliment.** Campinas, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TICE, R. et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing. **Environ. Mol. Mutagen.**, n. 35, p. 206-221, 2000.

TSI, D. et al. Clinical study on the combined effect of capsaicin, green tea extract and essence of chicken on body fat content in human subjects. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 49, p. 437-441, 2003.

TURNER, R. T. et al. Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats? **Endocrinology**, v. 140, n. 1, p. 50-54, 1999.

TURRENS, J. F.; LARICCIA, J.; NAIR, M. G. Resveratrol has no effect on lipoprotein profile and does not prevent peroxidation of serum lipids in normal rats. **Free Radic. Res.**, v. 27, p. 557-562, 1997.

VALADARES, M. C.; CASTRO, N. C.; CUNHA, L. C. Synadenium umbellatum: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 43, n. 4, p. 345-353, 2006.

VILLELA, I. V. et al. Bioensaios para o monitoramento de genotoxicidade ambiental. In: SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Genética toxicológica**. Porto Alegre: Alcance, 2003.

YOSHIOKA, M. et al. Effects of red-pepper diet on the energy metabolism in men. **J. Nutr. Sci. Vitaminol.**, v. 41, p. 647-656, 1995.

WU, J. M. et al. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (review). **Int. J. Mol. Med.**, v. 8, p. 3-17, 2001.

ZANCANARO, R. D. **Pimentas**: tipos, utilização na culinária e funções no organismo. 2008. 43 f. Monografia (Pós-Graduação em Gastronomia e Saúde) - Centro de Excelência em Turismo, Universidade de Brasília, Brasília.

## ARTIGO CIENTÍFICO

### AVALIAÇÃO DA GENOTOXIDADE DO CAPSIATE (*Capsicum annum*) E RESVERATROL SUPLEMENTADOS EM RATOS WISTAR ATRAVÉS DO TESTE DE MICRONÚCLEO

Francijane Ferreira Paixão<sup>I</sup>; Rosa Maria Barilli Nogueira<sup>II</sup>; Alessandra Melchert<sup>III</sup>, Dayane Aparecida Francisco da Silva<sup>IV</sup>; Nádia de Araújo Miguel<sup>V</sup>; Luciane de Souza Romero Nogueira<sup>V</sup>; Rogério Giuffrida<sup>VI</sup>

<sup>I</sup>Discente do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Unoeste, Presidente Prudente-SP, Brasil. Autor principal. Desenvolvimento experimental, coleta de dados, escrita do artigo.

<sup>II</sup>Professora Doutora do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Unoeste, Presidente Prudente-SP, Brasil. Orientadora. Responsável pelo conteúdo intelectual e científico do estudo e revisão crítica.

<sup>III</sup>Professora Doutora da Universidade Estadual Paulista, Unesp, Botucatu-SP, Brasil. Co-orientadora. Responsável pelo conteúdo intelectual e científico do estudo e revisão crítica.

<sup>IV</sup>Discente do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Unoeste, Presidente Prudente-SP, Brasil. Leitura das lâminas.

<sup>V</sup>Discente do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Unoeste, Presidente Prudente-SP, Brasil. Desenvolvimento experimental e coleta de dados.

<sup>VI</sup>Professor Doutor do Programa de Mestrado em Ciência Animal, Unoeste, Presidente Prudente-SP, Brasil. Análise estatística.

#### **Autor para correspondência**

Rosa Maria Barilli Nogueira  
Rua: Santo Brugnoli, 249– Bairro São Matheus  
19025-160 – Presidente Prudente – SP  
Fone: (18)99701-8633  
E-mail: rosa@unoeste.br

## RESUMO

**OBJETIVO:** avaliar os possíveis efeitos genotóxicos da suplementação com o capsiate, extraído da pimenta *Capsicum annuum* (pimenta doce), e do composto fenólico resveratrol, extraído de uvas, em ratos Wistar através do teste de micronúcleo em medula óssea.

**MÉTODOS:** sessenta e quatro ratos machos, adultos de linhagem Wistar, foram distribuídos em quatro grupos (n=16) e suplementados com: grupo controle negativo (GCN)- 0,5ml de solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo controle positivo (GCP)- 50mg/kg de ciclofosfamida; grupo capsiate (GC)- 10mg/kg de capsiate diluído em 0,5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%; grupo resveratrol (GR)- 30mg/kg de resveratrol diluído em 0,5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9%. Somente o GCP recebeu a administração por via intraperitoneal. Os demais grupos foram suplementados por gavagem sempre uma vez ao dia durante seis semanas. Ao final das seis semanas os animais foram anestesiados, sacrificados e realizado o teste de micronúcleo em medula óssea.

**RESULTADOS:** a frequência de micronúcleos em eritrócitos policromáticos do GCN, GCP, GC e GR foram, respectivamente,  $2,5 \pm 0,53$ ,  $5,7 \pm 1,03$ ,  $2,5 \pm 0,73$  e  $2 \pm 0,73$  em mil células. Na comparação entre os grupos observou-se diferença estatística significativa somente do GCP em relação aos demais grupos.

**CONCLUSÕES:** ao suplementar ratos Wistar com capsiate na dose de 10mg/Kg e resveratrol na dose de 30mg/Kg uma vez ao dia por seis semanas, conclui-se que ambos não causam genotoxicidade pois o teste de micronúcleo em medula óssea mostrou quantidades consideradas normais de micronúcleos em eritrócitos policromáticos.

**Descritores:** capsiate; resveratrol; micronúcleo; genotóxico

## ABSTRACT

**PURPOSE:** evaluate the possible genotoxic effects of supplementation with capsiate extracted Pepper *Capsicum annuum* (sweet pepper), and the phenolic compound resveratrol extracted from grapes in Wistar rats by the micronucleus test in bone marrow.

**METHODS:** Sixty-four male Wistar rats, adult were divided into four groups (n = 16) and supplemented with: negative control group (GCN) - 0.5 ml of sodium chloride 0.9%, positive control group (GCP) - 50mg/kg cyclophosphamide; capsiate group (CG) - 10mg/kg capsiate diluted in 0.5 mL of sodium chloride 0.9%; resveratrol group (RG) - 30mg/kg resveratrol diluted in 0.5 mL of 0.9% sodium chloride. Only the GCP received intraperitoneal administration. The other groups were supplemented by gavage once always a day for six weeks. At the end of six weeks the animals were anesthetized, sacrificed and the micronuclei test performed in bone marrow.

**RESULTS:** the frequency of micronuclei in polychromatic erythrocytes of the GCN, GCP, GC and GR were  $2.5 \pm 0.53$ ,  $5.7 \pm 1.03$ ,  $2.5 \pm 0.73$  and  $2 \pm 0.73$  in a thousand cells, respectively. When comparing both groups there was statistically significant difference only GCP compared to other groups.

**CONCLUSIONS:** the supplementary Wistar rats with a dose of 10mg/kg capsiate and resveratrol in a dose of 30mg/Kg once a day for six weeks, it was concluded that both do not cause genotoxicity as the micronuclei test in bone marrow showed normal amounts considered micronuclei in polychromatic erythrocyte.

**Key Words:** capsiate; resveratrol; micronuclei; genotoxic; rat

## INTRODUÇÃO

Atualmente é crescente a preocupação com a alimentação e seus constituintes, o que incentiva a indústria de alimentos a investir em produtos saudáveis e funcionais<sup>1</sup>. Este mercado, aliado ao interesse dos consumidores na prevenção de doenças, tem pressionado a indústria alimentícia na busca de novos produtos, direcionando assim pesquisas neste seguimento. Neste contexto, os capsinóides, provenientes das pimentas<sup>2</sup>, e o resveratrol, proveniente das uvas ganharam prestígio<sup>3</sup>.

As pimentas vermelhas são a principal fonte de capsaicinóides, que consistem de capsaicina, dihidrocapsaicina, nordihidrocapsaicina, homocapsaicina, entre outros<sup>4</sup>. A capsaicina dá a sensação de calor devido aos seus componentes químicos, capazes de estimular as papilas gustativas da boca<sup>5</sup>, fazendo com que as pimentas sejam consideradas estimulantes do apetite e auxiliares da digestão, pois o consumo desse aditivo aumenta a salivação, estimula a secreção gástrica e a motilidade gastrointestinal, proporcionando uma sensação de bem-estar<sup>6</sup>.

Entretanto, o uso da capsaicina a longo prazo pode ser limitado devido à sua elevada pungência, sendo alternativa o uso do capsiate ( pimenta doce), um cultivar não pungente extraídos da *Capsicum annum*, onde apresentam estrutura semelhante à dos capsaicinóides e análogo à capsaicina<sup>7</sup>.

O resveratrol é um composto polifenólico encontrado principalmente em uvas frescas, suco de uva e vinho<sup>8</sup>. É produzido pela pele das uvas em resposta à exposição fúngica. Na uva esta fitoalexina é sintetizada na casca como resposta ao stress causado por ataque fúngico (*Botrytis cinerea*, *Plasmopora viticola*), dano mecânico ou por irradiação de luz ultravioleta. Por existir na casca da uva, o resveratrol é extraído para o vinho durante a maceração necessária à sua produção<sup>9</sup>. Segundo Turner<sup>10</sup> (1999) o resveratrol tem sido usado em muitos estudos, como um mediador da proteção cardiovascular independente de álcool que seria conferida pela ingestão de vinho tinto. Protege o sistema cardiovascular por uma série de mecanismos incluindo: a inibição da oxidação de baixa densidade da lipoproteína mediada pelo resveratrol; a inibição da agregação plaquetária; a síntese de pró-aterogênicos; a inibição da proliferação celular, inibindo também a síntese de tromboxinas, portanto atuando como anticoagulante<sup>11, 12</sup>.

A propriedade anti-cancerígena do resveratrol foi apoiada pela sua capacidade de inibir a proliferação de uma grande variedade de células tumorais humanas *in vitro*<sup>13</sup>. Segundo Subbaramaiah *et al.*<sup>14</sup>, a atividade antiinflamatória do resveratrol é explicada pela inibição da transcrição e atividade da ciclooxigenase (COX-1 e COX-2).

Embora alimentos funcionais e nutracêuticos, como capsiate e resveratrol, estejam associados a efeitos benéficos a saúde, estudos que avaliam o potencial tóxico e genotoxicidade de plantas e nutracêuticos têm crescido com o aumento do uso terapêutico e com o interesse na comprovação da eficácia dos mesmos com as mais diversas finalidades farmacológicas.

Deste modo, o presente estudo objetivou avaliar se a suplementação com capsiate (*Capsicum annum*) na dose de 10mg/Kg ou resveratrol na dose de 30mg/Kg é capaz de produzir efeitos genotóxicos em ratos Wistar através do teste de micronúcleo em medula óssea.

## MÉTODOS

Este estudo foi protocolado (nº 1002) e aprovado pela Comissão de Ética no Uso de Animais Foram utilizados 64 ratos machos, adultos da linhagem Wistar, com média de 200 gramas de peso vivo, provenientes do Biotério Central da instituição.

Os animais permaneceram alojados em ambiente controlado, temperatura de 22°C±2 e fotoperíodo 12 horas claro/escuro, com ração (Labina<sup>®</sup>) e água à vontade.

Os ratos foram distribuídos em quatro grupos (n=16) e suplementados da seguinte forma:

Grupo controle negativo (GCN): 0,5ml de solução de cloreto de sódio 0,9% por gavagem uma vez ao dia durante seis semanas;

Grupo controle positivo (GCP): dose única de ciclofosfamida 50mg/kg via intraperitoneal (IP);

Grupo capsiate (GC): 10mg/kg diluído em 0,5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% por gavagem uma vez ao dia durante seis semanas;

Grupo resveratrol (GR n=16): 30mg/kg diluído em 0,5 mL de solução de cloreto de sódio 0,9% por gavagem uma vez ao dia durante seis semanas.

Ao final das seis semanas, foi realizada anestesia geral, com tiopental sódico (30 mg/Kg) associado ao zoletil (10 mg/Kg), nos animais do GCN, GC e GR. Após anestesia geral os animais foram submetidos à punção cardíaca e sacrificados por exsanguinação. O GCP foi anestesiado e sacrificado da mesma forma que os demais grupos 24 horas após a administração da ciclofosfamida.

Em seguida para a realização do teste do micronúcleo, foi removido o fêmur e sua epífise proximal foi cortada com o auxílio de uma tesoura e introduzido 1ml de soro fetal bovino



que em seguida foi aspirado. Essa suspensão sofreu homogeneização e foi centrifugada a 1500rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o botão de células homogeneizado. Uma gota da suspensão celular foi transferida para uma lâmina previamente limpa para a realização do esfregaço. As lâminas foram transferidas para uma estufa à 37°C por 1 hora e 30 minutos para ocorrer a secagem e fixação do material.

A coloração foi feita com a utilização de azul de metileno/Giemsa na forma concentrada por três minutos; e diluído em tampão fosfato (1:10) durante um minuto.

As lâminas foram analisadas em teste cego como recomenda Ribeiro *et al.*<sup>15</sup> em microscópio binocular (YS2 NIKON®) em aumento de 100x e contado o número de micronúcleos (MNs) em eritrócitos policromáticos (PCEs) segundo Schmid<sup>16</sup>. Foram analisados 1.000 eritrócitos por lâmina, em triplicata.

Previamente a análise, todos os grupos de dados foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para comprovar normalidade, pelo qual se constatou que as variáveis estudadas apresentaram distribuição não paramétrica ( $p < 0,05$ ). Para verificar se as contagens de micronúcleos diferiram entre grupos recorreu-se ao teste de Kruskal-Wallis com contrastes pelo método de Dunn. Todas as análises foram conduzidas com auxílio do Software Biostat 5.0, e foi adotando-se nível de significância de 5%<sup>17</sup>.

## RESULTADOS

Observou-se que os animais do GCN tratados com solução de cloreto de sódio 0,9% obtiveram média de 2,5 micronúcleos e o GCP onde foi usado a ciclofosfamida na dose de 50mg/Kg observou-se média de 5,7 micronúcleos, superiores aos da normalidade, diferindo significativamente ( $p < 0,05$ ) da média do GCN, GC (2,5MN) e GR (2MN) em 1000 PCEs (Tabela 1).

Os animais suplementados com capsiate com dose diária de 10mg/Kg apresentaram uma média de 2,5 micronúcleos em 1000 PCEs e os animais suplementados com uma dose diária de 30mg/Kg de resveratrol apresentaram uma média de 2 micronúcleos em 1000 PCEs.

Na comparação entre GCN, GC e o GR não houve diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ) (Tabela 1).

TABELA1 - Valores em médias e desvios-padrão do total de micronúcleos em eritrócitos policromáticos observados em células de medula óssea de ratos Wistar dos grupos controle negativo (GCN), grupo controle positivo (GCP) e dos grupos suplementados com capisate (GC) e resveratrol (GR).

<b>Grupos</b>	<b>Média±Desvio Padrão (MN/1000células)</b>
<b>GCN</b>	<b>2,5 ± 0,53</b>
<b>GCP</b>	<b>5,7 ± 1,03*</b>
<b>GC</b>	<b>2,5 ± 0,73</b>
<b>GR</b>	<b>2,0 ± 0,73</b>

\*  $p < 0,05$  x GCN, GC, GR

## DISCUSSÃO

O teste de micronúcleo baseia-se num aumento da frequência de eritrócitos policromáticos micronucleados, utilizando para isso, preferencialmente, células de mamíferos, medula óssea ou sangue periférico, de animais devidamente tratados<sup>18</sup>.

Ribeiro *et al.*<sup>15</sup> relatam que para os eritrócitos normocromáticos (NCEs) a frequência de células micronucleadas não aumenta da mesma forma que nos eritrócitos policromáticos (PCEs), e portanto não se faz necessária a sua análise. Rabello-Gay *et al.*<sup>19</sup> consideram como frequência normal, 3 micronúcleos para 1000 PCEs, desta forma, observou-se que os animais do GCN tratados com placebo apresentaram média abaixo da frequência considerada normal com ausência de atividade mutagênica, podendo ser considerado como base controle para o presente estudo.

No GCP onde foi utilizada a ciclofosfamida a genotoxicidade foi positiva, devido a média de micronúcleos estar alterada e bem acima dos valores normais, concluindo a presença de atividade mutagênica e concordando com outros autores que utilizaram o mesmo fármaco na mesma dose<sup>20,21</sup> ou doses diferentes mas também consideradas mutagênica como 2,0mg/Kg<sup>22</sup>, 40mg/Kg<sup>23</sup> e 200mg/Kg<sup>24</sup>. A ciclofosfamida teve ação sobre o material genético dos animais do grupo positivo, levando a danos no cromossomo, com quebra e desvio do seu ciclo normal, formando assim o micronúcleo. A ciclofosfamida é um antineoplásico com inúmeros relatos na literatura que apontam seu potencial carcinogênico e tem sido muito utilizada em roedores como grupo controle.

A quantidade de micronúcleos em eritrócitos policromáticos para o grupo capsiate ficou abaixo dos valores de normalidade proposto por Rabello-Gay *et al.*<sup>19</sup>, caracterizando ausência de atividade mutagênica nesta dose. Estes resultados concordam com estudos de Bernard<sup>25</sup>, onde relata teste *in vitro* e *in vivo*, que a dose de 500, 1000, 2000 mg/kg não tem efeito mutagênico, devido a frequência normal de micronúcleos e Watanabe *et al.*,<sup>26</sup> que também relatam em estudo *in vivo* usando dose única de 5000 mg/kg, não aumentou a incidência de eritrócitos policromáticos micronucleados, no entanto, alguns sinais clínicos de toxicidade, incluindo andar cambaleante, diminuição no movimento espontâneo, tremor, respiração ofegante e urina vermelho-acastanhada foram observados.

Os resultados deste estudo mostram que a dose de 30mg/Kg de resveratrol uma vez a dia durante 6 semanas não é genotóxica para ratos wistar e na literatura são encontrados dados semelhantes com doses de 50mg/Kg a 1000mg/Kg<sup>13</sup> e estudos com o trans-resveratrol (composto de polifenóis encontrados em diversos alimentos) nas doses de 50, 150, 500mg/Kg por 28 dias e doses de 700mg/Kg por 90 dias também não foram genotóxicos<sup>27</sup>. O resveratrol é um polifenol natural e estudos relatam que além de não causar danos ao DNA pode ter efeito protetor e antígenotóxico. Pesquisas relacionadas a diversos tipos de câncer mostram que o resveratrol pode atuar nos três estágios distintos da carcinogênese: iniciação, promoção e progressão por via de transdução de sinal de modulação que controlam a divisão celular e crescimento, angiogênese, inflamação, apoptose, e metástase<sup>13</sup>.

Um estudo recente realizado *in vivo* em ratos em cânceres de mama, colo-retal, fígado, pâncreas e próstata demonstram resultados positivos, neutros, bem como negativos, dependendo da via de administração do resveratrol, dosagem, modelo de tumor e outros fatores como idade, sexo, tempo e método de suplementação<sup>28</sup>.

Já com a aplicação tópica de resveratrol, Soleas *et al.*<sup>29</sup>, encontraram redução de 60% em papilomas, a qual os autores propuseram estar relacionados com a sua citotoxicidade e o seu potencial antioxidante.

## CONCLUSÕES

Conclui-se que o capsiate e o resveratrol não são genotóxicos e podem ser considerados como suplementos alimentares seguros, nas doses de 10mg/Kg e 30mg/Kg respectivamente.

## REFERÊNCIAS

- 1- Marques AC, Hautrive TP, Moura GB, Callegaro MGK, Hecktheuer LHR. Efeito da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) sob diferentes formas de prepare na resposta biológica em ratos. *Revista de Nutrição*, 2011; 131-141.
- 2- Dutra FLA, Branco IG, Madrona GS, Haminiuk CWI. Avaliação sensorial e influência do tratamento térmico no teor de ácido ascórbico de sorvete de pimenta. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial.*, 2010; 4(2):243-251.
- 3- Bachur CK, Bachur JA, Veiga, EV, Nogueira MS. Suplementação dietética com resveratrol na promoção da saúde: uma revisão sistemática. Artigo Original, *Rev Bras Nutr Clin.*, 2009; 24:23-8.
- 4- Luo XJ, Peng J, Yuan-Jian L. Recent advances in the study on capsaicinoids and capsinoids. *European Journal of Pharmacology.*, 2011; 650:1-7.
- 5- Zancanaro RD. Pimentas: tipos, utilização na culinária e funções no organismo. 2008. 43f. Monografia (Pós-Graduação em Gastronomia e Saúde) - Centro de Excelência em Turismo – CET, da Universidade de Brasília – UnB, Brasília.
- 6- Cardoso J, Martins J, Benites J, Conti T, Sohn V. Uso de alimentos termogênicos no tratamento da obesidade. 2010. 18f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Nutrição) - Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Nutrição Josué de Castro, Universidade Federal do Rio de Janeiro-Universidade do Brasil, Rio de Janeiro.
- 7- Ohnuki K, Haramizu S, Oki K, Watanabe T, Yazawa S, Fushiki T. Administration of capsiate, a non-pungent capsaicin analog, promotes energy metabolism and suppresses body fat accumulation in mice. *Biosci Biotechnol Biochem*, 2001; 65(21):2735-40.
- 8- Wu JM, Wang ZR, Hsieh TC, Bruder JL, Zou JG, Huang YZ. Mechanism of cardioprotection by resveratrol, a phenolic antioxidant present in red wine (Review). *Int.J.Mol.Med.*, 2001; 8(1):3-17.

- 9- De Lima RMT, Waffo-Teguo P, Teissedre PL, Pujolas A, Vaercauteren J, Cabanis JC, Merillon JM. Determination of stilbenes (trans-astringin, cis- and trans-piceid, and cis- and trans-resveratrol) in Portuguese wines. *J Agric. Food Chem.*, 1999; 47:2666-70.
- 10- Turner, Russell T., et al. "Is resveratrol an estrogen agonist in growing rats?" *Endocrinology*, v.140, n.1, p- 50-54, 1999.
- 11- Pace-Asciak CR, Hahn S, Diamandis EP, Soleas G, Goldberg DM. The red wine phenolics trans-resveratrol and quercetin block human platelet aggregation and eicosanoid synthesis: implications for protection against coronary heart disease. *Clin Chim Acta*. 1995;235(2):207-19.
- 12- Pendurthi US, Rao LVM. Resveratrol suppresses agonist-induced monocyte adhesion to cultured human endothelial cells. *Thromb Res.*, 2002;106(4):243-8.
- 13- Athar M., Back JH., Tang X, Kim KH, Kope A, Lovich L, Bickers DR, Kim AL. Resveratrol: A Review of preclinical studies for human cancer prevention. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 2007; 224:274-283.
- 14- Subbaramaiah K, Chung WJ, Michaluart P, Telang N, Tanabe T, Inoue H, Jang M, Pezzuto JM, Dannenberg AJ. Resveratrol inhibits cyclooxygenase-2 transcription and activity in phorbol ester-treated human mammary epithelial cells. *Journal of Biological Chemistry*, 1998; 273(34): 21875-882.
- 15- Ribeiro, L.R.; Salvadori, D.M.F.; Marques, E.K. 2003. Mutagênese ambiental. 1ed. Editora Ulbra. Canoas, 356p.
- 16- Schmid W. 1975. The micronucleus test. *Mutat Res*. 31:9-15.
- 17- Ayres M, Ayres Júnior M, Ayres DL, Santos AA. BIOESTAT –Aplicações estatísticas nas áreas das ciências biomédicas. Ong Mamiraua. Belém, 2007.
- 18- Flores M., Yamaguchi MU. Teste do micronúcleo: uma triagem para avaliação genotóxica. *Revista Saúde e Pesquisa.*, 2008; 1(3):337-340.
- 19- Rabello-Gay MN, Rodrigues MALR, Monteleone Neto R. Mutagênese, teratogênese e carcinogênese: métodos e critérios de avaliação. *Revista Brasileira de Genética*, 1991;
- 20- Neto JXA, Medeiros FPM, Melo AJM., Silva JC, Dantas JP. Avaliação do efeito mutagênico da palma forrageira (*Opuntia fícus-indica* Mill) através do Teste de Micronúcleos em medula óssea de ratos (*Rattus norvegicus*, linhagem Wistar) in vivo. *Revista de Biologia e Ciências da Terra.*, 2005; 5(2):1-10.
- 21- Primo MS, Calliari CM, Castro-Gómez RJH, Mauro MO, Mantovani MS, Oliveira RJ. Avaliação da mutagenicidade e antimutagenicidade de um biopolímero extraído do

microorganismo *Agrobacterium radiobacter* em camundongos Swiss. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010; 20(3):340-47.

22- Magalhães EA, Júnior GJS, Campos TA, Silva LP, Silva RMG. Avaliação do potencial genotóxico do extrato bruto de *Pyrostegia venusta* (Ker Gawl.) Miers, Bignoneaceae, em medula óssea de camundongo. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010; 20(1):65-69.

23- Santos FV, Calvo TR, Cólus IMS, Vilegas W, Varanda EA. Mutagenicity of two species of the genus *Alchornea* measured by *Salmonella* microsome assay and micronucleus test. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 2010; 20(3):382-89.

24- Valadares MC, Castro NC, Cunha LC. *Synadenium umbellatum*: citotoxicidade e danos ao DNA de células da medula óssea de camundongos. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, 2007; 43(4):631-38.

25- Bernard BK, Watanabe E, Kodama T, Tsubuku S, Otabe A, Nakajima M, Masunori S, Shimada S, Tanaka J, Masuyama T. Studies of the toxicological potential of capsinoids V: Genotoxicity studies in dihydrocapsiate. *Int J Toxicol.*, 2008, 27(3):59-72.

26- Watanabe ET, Kodama T, Masuyama S, Tsubuku M, Nakajima, Bernard BK. Studies of the toxicological potential of capsinoids: VI. Single-dose Toxicity and micronucleus test of dihydrocapsiate. *Int. J. Toxicol.* 2008; 27(3):73-7.

27- Williams LD, Burdock GA, Edwards JA, Beck M, Bausch J. Safety studies conducted on High-purity trans-resveratrol in experimental animals. *Food Chem Ticol.*, 2009; 47(9), 2170-82.

28- Carter LG, Dorazio JA, Pearson KJ. Resveratrol and câncer: a focus on in vivo evidence. *Endocr Relat Cancer.*, 2014; (5):494-506.

29- Soleas GJ, Grass L, Josephy PD, Goldberg DM, Diamandis EP. A comparison of the anticarcinogenic properties of four red wine polyphenols. *Clin Biochem.*, 2002; 35:119-

**ANEXO – NORMAS PARA PUBLICAÇÃO**

ISSN 0102-8650 *versão  
impressa*  
ISSN 1678-2674 *versão  
online*

### **Objetivo e política editorial**

A Revista Acta Cirúrgica Brasileira tem um padrão, estilo, regras e normas que devem ser cumpridas. Seguir as Instruções aos Autores em [www.scielo.br/acb](http://www.scielo.br/acb) (português/inglês). Observar os modelos nos artigos publicados. Revisão acurada do manuscrito antes de enviar.

#### **Manuscrito que não cumprir as instruções não será aceito**

A **Revista Acta Cirúrgica Brasileira** cumpre as normas do International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Ethical Considerations in the Conduct and Reporting of Research: Authorship and Contributorship disponível em [www.icmje.org](http://www.icmje.org)

A **Revista Acta Cirúrgica Brasileira** considera todos os participantes do artigo como autores. Autores são considerados aqueles que têm efetiva contribuição intelectual e científica na realização do trabalho.

Identificar o autor principal. O autor principal é o responsável pela integridade do artigo, como um todo, não necessariamente ser o primeiro autor. A correspondência deve ser no nome dele. O autor principal assume a responsabilidade pela participação efetiva de cada autor e que todos os autores concordaram com o conteúdo do artigo. Encaminhar lista com a assinatura de cada autor.

A Revista não aceita alunos de graduação e pós-graduação como autores principais. O autor principal será sempre o Tutor/Professor Orientador e responsável pelo conteúdo intelectual e científico do artigo.

Deve informar a contribuição de cada autor nominado no artigo submetido à publicação

1. Concepção, delineamento do estudo;



2. Aquisição dos dados;
3. Interpretação dos dados;
4. Procedimentos técnicos;
5. Exames macroscópicos e histopatológicos;
6. Análise estatística
7. Redação do manuscrito;
8. Revisão crítica;

Pessoas que não cumprem estes requisitos e que tiveram participação puramente técnica (ato operatório, revisão bibliográfica, chefes de departamento, serviços ou financiados) devem ser listados nos agradecimentos. Mencionar o responsável pela versão para o idioma inglês.

Alunos envolvidos formalmente em projetos [iniciação científica, em nível de Mestrado e Doutorado] podem ser considerados como primeiro autor e o professor responsável, como último autor.

Não é papel do editor arbitrar conflitos relacionados à autoria. Segue as normas recomendadas por alguns Comitês de Ética e políticas de bases de dados internacionais conforme os links a seguir: Procedimentos da SciELO, Código de conduta do COPE (Committee on Publication Ethics), International Committee of Medical Journal Editors, PUBMED/MEDLINE

**Acta Cirúrgica Brasileira** tem os artigos avaliados pelos pares (*peer-review*). Os artigos são analisados por especialistas que não integram o Corpo Editorial. O Editor Científico verifica os conflitos existentes entre pareceristas e encaminha para novo revisor. A Revista possui Conselho Consultivo Nacional e Internacional. Cada manuscrito é apreciado pelo Editor ou um dos Editores Associados. O Editor Chefe tem plena autoridade sobre o conteúdo editorial da revista.

Os Suplementos da revista podem ter objetivos úteis para cooperação entre Instituições Acadêmicas. O Editor Chefe terá a autoridade de enviar os suplementos para apreciação de pareceristas que poderão rejeitar artigos. É fundamental distinguir nas referências os artigos de suplementos e os da publicação regular.

A Revista não aceita relato de caso ou de casos/trabalhos retrospectivos e revisão não solicitada pelo Corpo Editorial.

Devem ser enviados artigos de pesquisa, preferencialmente de cirurgia experimental.

Revisões sistemáticas e metanálises enfocando temas cirúrgicos de interesse atual serão consideradas para publicação. Todas as metanálises de ensaios randomizados deverão atender os princípios do QUORUM (Lancet. 1999; 354: 1896-1900) e o manuscrito submetido deverá conter o fluxograma detalhado da revisão sistemática.

## Preparação dos manuscritos

Os artigos devem ser enviados por e-mail para o Editor Chefe ([sgolden@terra.com.br](mailto:sgolden@terra.com.br)) e redigidos no idioma inglês. O texto e o abstract devem ser revistos por especialistas da área médica, habituados com a redação científica do idioma.

### Página inicial

O título do artigo deve ser conciso, mas informativo. Inserir o número um (algarismo arábico), sobrescrito, indicando após as referências o local da realização da pesquisa (laboratório, centro de pesquisa, disciplina, departamento e instituição). Não incluir siglas.

O nome completo de todos os autores com os números subsequentes sobrescritos (algarismo romano) que indicará **a categoria acadêmica (cargo universitário) mais elevada de cada um, com o nome da disciplina/departamento e da instituição**. Informar se tem bolsa de pesquisador do CNPq e respectivo nível.

Observar os títulos acadêmicos no idioma inglês. Consultar *Acta Cir Bras. 2006;21(2):60 Mar-Abr. Academic degrees examples*

Acadêmicos são bem-vindos. É desejável que tenham Bolsa de Iniciação Científica do CNPq (**PIBIC**) e especificada a contribuição intelectual e científica de acordo com seu nível.

Alunos em nível de Mestrado e Doutorado devem referir o nome do Programa conforme a CAPES. Podem ser considerados como primeiro autor e o Professor Orientador como último autor e autor correspondente.

### ABSTRACT

O abstract não deve exceder 200 palavras e deve ser apresentado de forma estruturada:

**Purpose** (claro, preciso e conciso, sem comentários).

**Methods** (amostra e procedimentos).

**Results** (Principais achados e fornecendo dados específicos e significância estatística).

**Conclusion** (clara, precisa e concisa, respondendo o objetivo, sem comentários).

Os **key words** devem constar no DeCS/MeSH.

Acessar <http://decs.bvs.br>. Termos que não fazem parte do DeCS impedem a localização do artigo.

## **Estrutura do manuscrito**

### **Introdução**

Deve apresentar o estado atual do tema e oferecer somente citações pertinentes, sem fazer revisão extensa do assunto. Autores devem ser apresentados em letras minúsculas ou simplesmente citados por números sobrescritos, sem o ano do artigo. O objetivo da pesquisa deve ser claro, preciso e conciso.

### **Métodos**

Deve apresentar a amostragem (quantidade e qualidade) e os procedimentos em pormenores suficientes que permitam a outros pesquisadores reproduzirem os resultados. Identificar, precisamente, todas as drogas, substâncias químicas e produtos utilizados, incluindo os nomes genéricos, dosagens e formas de administração. Não referir nomes de pacientes, iniciais ou número do protocolo hospitalar. Descrever os métodos estatísticos com pormenor e fornecer referências para os procedimentos consagrados.

### *Ética*

A investigação em seres humanos deve ser submetida ao Comitê de Ética da Instituição (enviar declaração assinada que aprova a pesquisa), cumprindo a Declaração de Helsinki de 1975, revisada em 2008 (World Medical Association [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) e a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde ([http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso\\_96.htm](http://conselho.saude.gov.br/resolucoes/reso_96.htm)).

A investigação em animais deve ser submetida à Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA). Enviar declaração assinada de aprovação da pesquisa, cumprindo a Lei Federal nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2008/Lei/L11794.htm) e o Decreto nº 6.689, de 15 de julho de 2009 que regulamentada a Lei no 11.794, disponível em: [http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6899.htm).

Artigos de autores estrangeiros devem seguir o Council for International Organization of Medical Sciences (CIOMS) ethical code for animal experimentation (WHO Chronicle. 1985; 39(2): 51-6)

O Corpo Editorial da Revista poderá recusar artigos que não

cumpram rigorosamente os preceitos éticos da pesquisa.

## Resultados

No texto enfatizar as observações importantes. Incluir os dados de significância estatística. Apresentar em sequência lógica no texto, usando:

**Tabelas:** são abertas e numeradas consecutivamente (algarismos arábicos) e apresentar um **título breve, colocado acima**. Utilizar abreviaturas aprovadas e padronizadas. As abreviaturas não padronizadas devem ser explicadas em notas de rodapé da tabela.

**Quadros:** são fechados, com dados descritivos e apresentar um título breve, **colocado acima**.

**Figuras [Ilustrações, fotografias e gráficos]:** devem ser de boa qualidade. Não repetir no texto todos os dados constantes das tabelas e/ou figuras. As figuras também devem ser numeradas sequencialmente em algarismos arábicos. As legendas devem aparecer **abaixo da figura**.

## Discussão

Enfatizar os aspectos novos e relevantes do estudo. Comparar os métodos e resultados com os anteriormente publicados. Cotejo entre as observações próprias com a de outros autores. Enfatizar novos e importantes aspectos do estudo. **NÃO REPETIR RESULTADOS.**

## Conclusão

Deve ser clara e concisa e responder aos objetivos do estudo. **Evitar comentários e repetição de dados.**

## Referências

### Siga modelo de artigos publicados

A Revista cumpre as normas de Vancouver: *Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals do International Committee of Medical Journal Editors* ([www.icmje.org](http://www.icmje.org)). **O Editor leva em consideração a seriedade e ao apuro nas referências. São importantes como a própria pesquisa. Deve ter revisão rigorosa e acurada.**

O autor principal deve realizar a revisão acurada das referências conforme MEDLINE/PubMed (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>) Os títulos dos periódicos devem ser abreviados de acordo com o estilo usado na lista de revistas indexadas no MEDLINE/PubMed.

Deve-se referir artigo pertinente ao tema

As referências devem ser numeradas consecutivamente na ordem em que foram mencionadas a primeira vez no texto, com respectivo número sobrescrito.

Os nomes de todos os autores devem ser citados nas referências (**et al não é aceito**).

As referências devem ser atualizadas, selecionadas e utilizadas as mais importantes, pertinentes à pesquisa, publicados em periódico indexado. Evitar o número excessivo de referências.

Não são aceitas referências a resumos, comunicação pessoal ou qualquer outra fonte não indexada (**livros texto e teses**).

**Não se repete a dezena, centena, milhar da página final do artigo.**

### **Exemplos de referências**

#### **Artigo de revista**

Diethelm AG. Surgical management of complications of steroid therapy. *Ann Surg.* 1977;185(3):251-63.

Park HK, Fernandez I, Dujovny M, Diaz FG. Experimental animal models of traumatic brain injury: medical and biomechanical mechanism. *Crit Rev Neurosurg.* 1999;9:44-52.

#### **Agradecimentos**

Reconhecer aqueles que contribuíram para o trabalho, mas sem possuírem as características de autores.

**Correspondência:** Nome completo do autor principal, e-mail, endereço e telefones.

**Declarar:** Conflito de interesse e fonte de financiamento.

**No final do manuscrito: mencionar o local da realização da pesquisa:** laboratório/centro de pesquisa/disciplina/departamento/instituição.

Se aluno de Programa de Pós-graduação, informar se o artigo é parte de tese, nível mestrado, doutorado ou pós-doutorado e nome do Professor Orientador/Tutor.

Exemplo: <sup>1</sup>Research performed at Laboratory ....., Department....., Institution....., City,. Brazil. Part of Master or PhD degree thesis, Postgraduate Program [name

according to CAPES] University..... Tutor: Name..

### **Fluxograma do manuscrito**

1. O manuscrito será avaliado quanto à forma e o estilo da revista, conforme as instruções aos autores. **O artigo será devolvido se não cumprir as normas.**
2. O manuscrito será submetido aos pareceristas para apreciação e aprovação.
3. Após aprovação o artigo será publicado de acordo com a data da submissão. O editor tem o direito de realizar adaptações do texto conforme norma e estilo da revista.

**Consultar fascículos recentes da Revista disponíveis em [www.scielo.br/acb](http://www.scielo.br/acb).**

Documentos a serem enviados pelo correio ou e-mail: Transferência dos Direitos de Reprodução, Certificado da Comissão de Ética (CEUA ou CEP) da Instituição e Declaração do conflito de interesses.

Os autores cujos trabalhos forem aceitos para publicação pela revista transferem todos os **direitos de reprodução (copyright)** a **Acta Cirúrgica Brasileira**, de acordo com o Ato de Direitos Autorais de 1976. Uma carta contendo essa declaração deve ser encaminhada junto com o artigo, assinada por todos os autores.

### **Modelo**

"Os autores abaixo assinados transferem todos os direitos autorais do artigo intitulado " \_\_\_\_\_ " à **Acta Cirúrgica Brasileira**. Garantem que o artigo é original, não infringe qualquer direito autoral ou direito à propriedade de terceiros, não está em avaliação por outro periódico e não foi previamente publicado. O trabalho foi lido e cada um dos autores confirma sua contribuição"

Nome legível e assinatura

**Declaração do conflito de interesse**, a fim de cumprir a Resolução do Conselho Federal de Medicina n.1595/2000, que veda artigos, mensagens e materiais promocionais de produtos ou equipamentos de uso na área médica.