

Efeito antimutagênico do resveratrol obtido a partir do bagaço da vinicultura

Silvia Candida Bottiⁱ

Silvia Pierre Irazustaⁱⁱ

Registro DOI: <http://dx.doi.org/10.22280/revintervol11ed3.391>

Resumo

O resveratrol é um polifenol presente em uvas de variedade *Vitis vinífera*, americanas e híbridas amplamente conhecido por seu valor terapêutico e cosmético, além de ser um antioxidante natural. O presente trabalho propôs confirmar, por meio de ensaio *in vitro*, a sua propriedade anti-câncer, bem como a aplicação biológica do princípio ativo. A atividade anti-mutagênica foi testada por meio do ensaio de *Allium cepa*. Sementes de *A. cepa* foram expostas ao herbicida trifluralina juntamente com diferentes concentrações do resveratrol. Os resultados confirmaram a atividade anti-mutagênica do resveratrol, pela reversão do efeito mutagênico da trifluralina, que foi proporcional à concentração, até 1ppm, após a qual não houve efeito adicional.

Palavras-chave: Bagaço de Uva. Resveratrol. *Allium cepa*. Antimutagênese.

Antimutagenic effect of resveratrol obtained from grape pomace

Abstract

Resveratrol is a polyphenol present in grapes of the *Vitis vinifera*, American and hybrid variety widely known for its therapeutic and cosmetic value, as well as being a natural antioxidant. The present work proposed to confirm, by means of *in vitro* test, its anti-cancer property, as well as the biological application of the active principle. The anti-mutagenic activity was assayed by the *Allium cepa*. *A. cepa* seeds were exposed to the herbicide trifluralin together with different concentrations of resveratrol. The results confirmed the anti-mutagenic activity of resveratrol by reversing the mutagenic effect of trifluralin, which was proportional to the concentration, up to 1ppm, after which there was no additional effect.

Keywords: Grape Pomace. Resveratrol. *Allium cepa*. Antimutagenesis.

Recebido em 14/05/2018 Aceito em 02/10/2018

1 INTRODUÇÃO

Muitos destes compostos químicos sintéticos, como por exemplo, os herbicidas ou praguicidas utilizados na agricultura, podem trazer transtornos à saúde humana e animal, uma vez que cresce o número de evidências de alterações pela exposição a estes agentes químicos (VARANDA, 2006) como a trifluralina (FERNANDES, 2005) e glifosato (CAVALCANTE, 2008). Estas substâncias podem induzir mutações no DNA e, conseqüentemente, podem favorecer o desenvolvimento de tumores. Substâncias anti-mutagênicas, como a cúrcuma, *Agaricus brasiliensis* (cogumelo) (ANTUNES *et al.*, 2000) (SOUZA, 2007), o própolis verde (ROBERTO, 2009) e resveratrol (CARTER, 2014), podem reverter ou anular estes efeitos (ANTUNES *et al.*, 2000).

Os fatores que promovem a iniciação ou progressão da carcinogênese são chamados de carcinógenos. Carcinógenos atuam em um ou mais dos três estágios da carcinogênese (Spence e Jonhston, 1996) Na iniciação produzem mutações genéticas, onde uma célula normal é transformada em célula maligna (LOUREIRO *et al.*, 2002; VARANDA, 2006).

Substâncias endógenas advindas da alimentação ou sintetizadas pelas células, exibem algum tipo de atividade inibitória para agentes mutagênicos naturais e artificiais (ODIN, 1997). Os estudos com agentes antimutagênicos iniciaram nos anos cinquenta, porém recentemente é que os grupos de pesquisas têm se concentrado na identificação destes agentes, principalmente de origem natural como, a cúrcuma, *Agaricus brasiliensis* (cogumelo) (ANTUNES *et al.*, 2000) (SOUZA, 2007), o própolis verde (ROBERTO, 2009) e o resveratrol (CARTER, 2014).

Os biomarcadores são úteis e podem ser definidos como sistemas indicadores que geralmente incluem um organismo completo, usado para identificação de um alvo específico (SILVA e PEG, 2003). Sistemas testes vegetais como o de *Vicia faba*, *Zea mays*, *Tradescantia* sp e principalmente o de *Allium cepa*, têm sido amplamente utilizados para o estudo e detecção de genotoxicidade e mutagenicidade (FISKËJO, 1985; GRANT, 1994; FERNANDES, 2005).

Esses sistemas também têm importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos puros (MA *et al.*, 1995).

Fiskesjö (1985) ressaltou a importância e a utilidade de sistemas testes vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade e enfatizou que, apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, e que a ativação de pró mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas tratadas

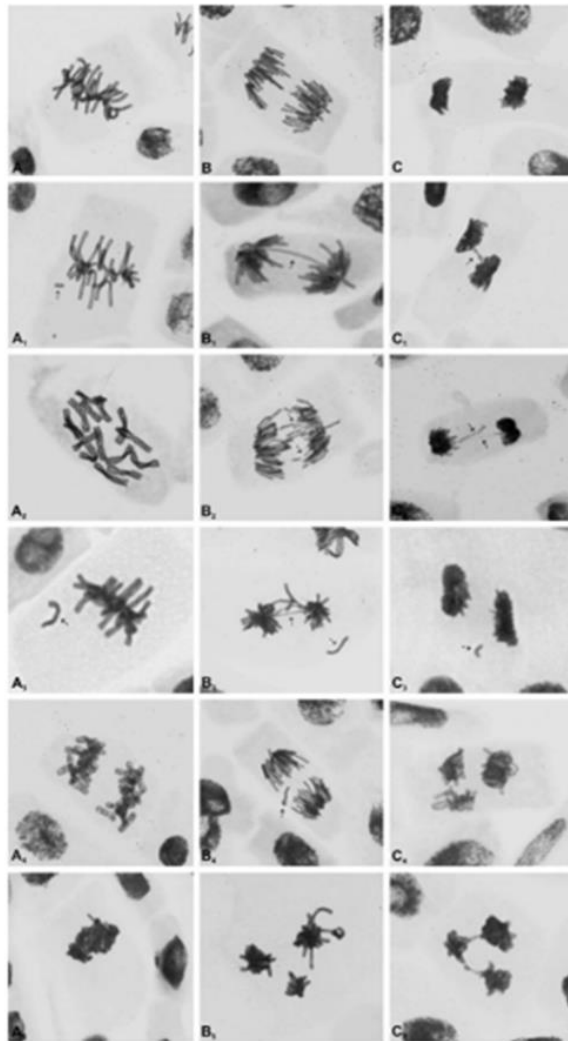
com agentes químicos. O uso de vegetais superiores no diagnóstico e no monitoramento da poluição ambiental tem sido utilizado por diversos autores. O ensaio com *Allium cepa* (cebola) tem sido utilizado na determinação dos efeitos citotóxicos, genotóxicos e mutagênicos de inúmeras substâncias (GRANT, 1994), bem como em amostras ambientais complexas (SOUZA *et al.*, 2007).

O método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *Allium cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento *in situ* da genotoxicidade de substâncias ambientais ou químicos puros (CABRERA e RODRIGUEZ, 1999).

Entre os vegetais superiores, justifica-se o emprego da planta *Allium cepa* como um eficiente organismo-teste de genotoxicidade e mutagenicidade devido às suas determinadas características, como sua cinética de proliferação, crescimento rápido de suas raízes, grande número de células em divisão, sua alta tolerância a diferentes condições de cultivo, sua disponibilidade durante o ano todo, seu fácil manuseio e por possuir cromossomos em número reduzido e de grande tamanho (FISKESJÖ, 1985; GRANT, 1994), além de seu baixo custo (LEME e MARIN-MORALES, 2009). Esta espécie tem sido utilizada, com sucesso, na avaliação de químicos, sendo eles substâncias puras ou misturas complexas (FISKESJÖ, 1985; MA *et al.*, 1995; MAZZEO *et al.*, 2010 VENTURA-CAMARGO *et al.*, 2011). A presença de aberrações cromossômicas (AC) avaliadas na região meristemática das raízes representam efeitos genotóxicos decorrentes da exposição à compostos tóxicos ou amostras ambientais complexas. A Figura 1 ilustra algumas das ACs que podem ser observadas nas raízes de *Allium cepa* após exposição a agentes físicos ou químicos (Leme e Marin-Morales, 2009).

Figura 1. AC observadas em células meristemáticas expostas a agentes químicos; (A) Metafase normal; (A1) Quebra cromossômica em metáfase ; (A2) C-metafase; (A3) Metáfase com quebra cromossômica; (A4) Célula binucleada em metáfase; (A5) Metafase com aderência; (B) Anáfase normal: (B1) Anáfase com ponte cromossômica; (B2) Anáfase com quebras cromossômicas; (B3) Anáfase com ponte e perda cromossômica: (B4) Anáfase com perda cromossômica; (B5) Anáfase multipolar ; (C) Telófase normal; (C1) Telofase com ponte

crrossômica; (C2) Telofase com ponte e perda crrossômica; (C3) Telófase com quebra cromossômica ; (C4) Telófase Multipolar; (C5) Telófase Multipolar telophase com ponte cromossômica. (Leme e Marin-Morales, 2009)

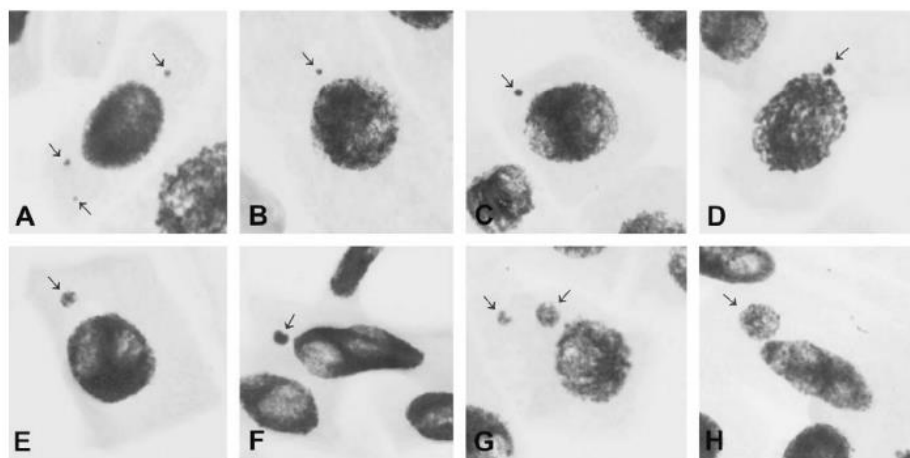


Fonte: Adaptado de LEME e MARIN-MORALLES (2009)

A análise de micronúcleos (MN) serve como teste de mutagenicidade e é um dos poucos métodos diretos para mensurar danos em sistemas expostos a agentes mutagênicos potenciais e o teste de *Allium cepa* tem sido amplamente empregado com esse propósito (SILVA e PEG 2003). A figura 2 ilustra a presença de MNs em diferentes fases e diferentes tamanhos naas células meristemáticas de *A. cepa*. O índice de germinação é usado como indicadore de

proliferação adequada das células (GADANO, 2002) o que também pode ser medido através deste bioensaio.

Figura 2. Células Meristemáticas de *A. cepa* contendo MN. (A–C) MN de pequeno tamanho em interfase; (D) MN de pequeno tamanho em prófase; (E–F) MN de grande tamanho em intérfase; (G–H) MN de grande tamanho em prófase. (Leme e Marin-Morales, 2009)



Fonte: Adaptado de LEME e MARIN-MORALLES (2009)

A avaliação da atividade anti-câncer atribuída ao resveratrol, por meio de ensaio *in vitro*, contribuirá para o conjunto de dados experimentais a cerca da atividade biológica deste princípio ativo.

2 METODOLOGIA

Bioensaio de *Allium cepa*

Os ensaios para avaliar o potencial anti-mutagênico do resveratrol, foram realizados de acordo com o protocolo proposto por Leme e Marin-Morales (2009), com adaptações. Sementes de *Allium cepa* ($2n = 16$ cromossomos) de um mesmo lote e mesma variedade *baia periforme*, foram utilizadas para avaliação dos efeitos antimutagênicos dos extratos de Revinter, v. 11, n. 03, p. 137-149, out. 2018.

resveratrol. Placas de petri contendo 100 sementes de *A. cepa*, foram expostas, respectivamente, a 2 mL de água destilada, 0,84ppm de trifluralina (CAS N°1582-09-8); 0,84 ppm de trifluralina + 0,5 ppm de resveratrol; 0,84 ppm de trifluralina + 1,0 ppm de resveratrol e 0,84 ppm de trifluralina + 2,0 ppm de resveratrol. O índice de germinação das sementes de *Allium cepa* foi calculado segundo a fórmula (1)(ROBERTO 2009):

$$IG = \frac{n \text{ de raízes germinadas}}{n \text{ de raízes não germinadas}} \times 100 \quad (1)$$

Após a determinação do IG, as raízes foram coletadas e colocadas em frascos contendo o fixador Carnoy (3:1, ácido acético e álcool) por 24 horas. Após este tempo foram separadas das sementes e colocadas em Etanol 70% e mantidas em geladeira até a leitura das lâminas. Para preparo das raízes, as mesmas foram hidrolisadas com HCl 1N, por 10 minutos a 60°C. Após nova lavagem em água destilada, as raízes foram submetidas ao reativo de Schiff por, aproximadamente, 2 horas, em ausência de luz. Com os meristemas corados e lavados em água corrente, foram confeccionadas 5 lâminas de cada tratamento, para a avaliação de possíveis presenças de aberrações cromossômicas e micronúcleos, levando-se em conta a porcentagem de ocorrência de cada uma delas. A montagem das lâminas utilizou um fragmento da porção meristemática e outro da porção F₁ das raízes, os quais foram macerados entre lâmina e lamínula com uma gota de carmim acético. Em cada lâmina foram analisadas, aproximadamente, 500 células da região meristemática. Este mesmo procedimento foi utilizado para a análise das células da geração F₁. A observação foi feita em microscopia óptica, sob o aumento de 400x.

Para a análise dos efeitos mutagênicos e antimutagênicos sobre as células meristemáticas, foram observadas e anotadas todas as ocorrências de micronúcleos e AC. Para a geração F₁, considerou-se apenas o número de micronúcleos. Para os efeitos genotóxicos foram observados e contabilizados todos os possíveis tipos de AC encontradas nas células meristemáticas. Todos estes tipos de aberrações (brotos nucleares, células binucleadas, células poliplóides, aderências cromossômicas, C-metáfases, perda de cromossomos, pontes cromossômicas, anáfases multipolares e com ponte) foram computados num único grupo, que foi denominado Índice de Genotoxicidade (IG) e o número de micronúcleos na F₁, correspondeu ao Índice de Mutagenicidade (IM).

Determinação do efeito antimutagênico

A atividade antimutagênica foi avaliada pela análise da porcentagem de redução de danos para cada um dos tratamentos com os extratos de resveratrol. Para determinar esta porcentagem, foi utilizada a seguinte fórmula (2) (ROBERTO 2009):

$$\text{Redução(\%)} = \frac{a-b}{a-c} \times 100 \quad (2)$$

Onde: a = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no controle positivo;

b = Número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes nos tratamentos;

c = número de células micronucleadas ou com quebra cromossômica presentes no controle negativo.

Análise Estatística

Para as comparações entre os grupos de tratamento para atividade anti-mutagênica, foi utilizado o teste Anova *oneway*, seguido do pós-teste de Bonferroni através do programa GraphPad Prism versão 5,0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

3 RESULTADOS

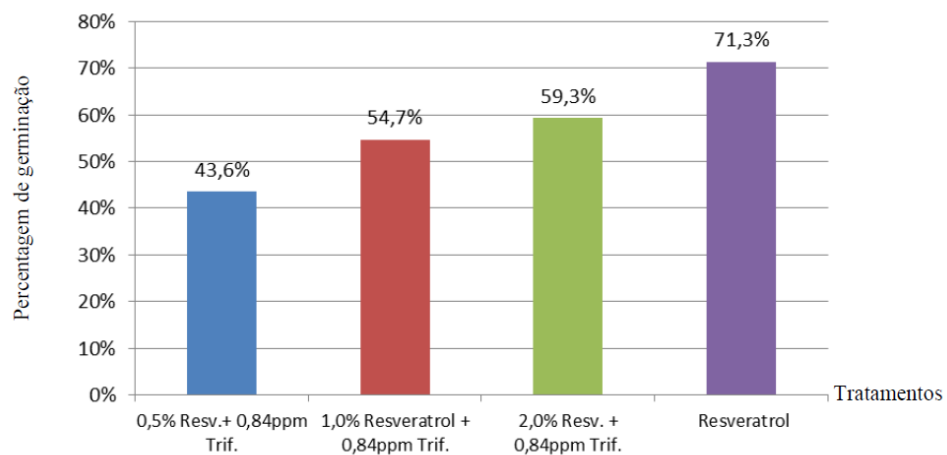
A avaliação da ação do resveratrol sobre a germinação das sementes mostrou um efeito positivo e dependente de concentração, quando se comparou a exposição das sementes a um agente tóxico conhecido (trifluralina) e ao resveratrol. A Tabela 1 e a figura 3, mostram estes resultados, observa-se uma atenuação do efeito inibitório da trifluralina.

Tabela 1 - Índice de germinação: efeito positivo do resveratrol sobre a inibição da germinação pela trifluralina

Tratamentos	Índice de Germinação
0,5% Resveratrol + 0,84ppm Trifluralina	43,6%
1,0% Resveratrol + 0,84ppm Trifluralina	54,7%
2,0% Resveratrol + 0,84ppm Trifluralina	59,3%
Resveratrol	71,3%

Fonte: Autoria própria.

Figura 3- Índice de Germinação

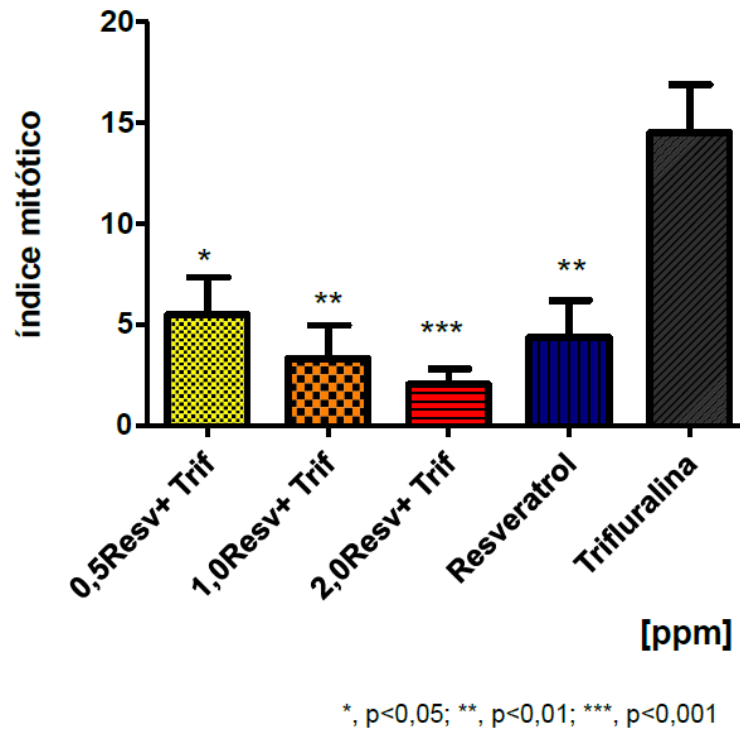


Fonte: Autoria própria.

Com relação aos efeitos sobre a ação genotóxica e mutagênica da trifluralina, também se observou uma atenuação destes efeitos, tanto quando se mediu a genotoxicidade (Figura 4), quanto quando se avaliou a mutagênese pelo índice de micronúcleo (IMN) (Figura 5). Com relação aos efeitos mutagênicos, obteve-se uma redução de 90,97% para o resveratrol a 0,5 ppm e 95% para 1 ppm e 2,0 ppm. A redução foi proporcional à concentração até 1 ppm do composto, a partir da qual há uma estabilização do efeito, isto é, não há efeito benéfico adicional. O efeito

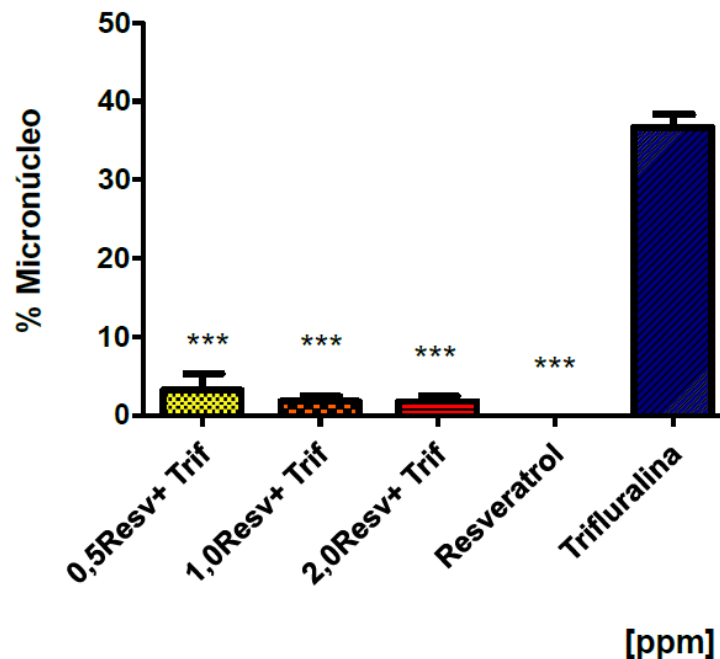
sobre a genotoxicidade e mutagenicidade induzidas pela Trifluralina estão demonstrados nas Figuras 4 e 5, respectivamente.

Figura 4 - Atividade anti-genotoxicidade do resveratrol sobre a trifluralina



Fonte: Autoria própria.

Figura 5 - Atividade antimutagenicidade do resveratrol sobre a trifluralina



*, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$

Fonte: Autoria própria.

4 DISCUSSÃO

Fiskejö, (1985), Fiskesjö (1993) Gadano, *et al.*, 2002, Silva, *et al.*, 2002, Caritá & Marin-Morales MA. (2008), Ventura-Camargo, (2011), Cuchiara, *et al.*, (2012), demonstraram a importância do sistema de *Allium cepa* para a avaliação da genotoxicidade e mutagenicidade de compostos e misturas, podendo ser prospectado a outros organismos, como os mamíferos, por possuir sistemas enzimáticos semelhantes. O *Allium cepa* se apresenta como um modelo eficaz, com alta sensibilidade.

O presente trabalho demonstrou o potencial anti-genotóxico e anti-mutagênico do resveratrol no modelo de *Allium cepa*, em relação à trifluralina, conhecido herbicida de ação clastogênica (FERNANDES, 2005). Após o tempo de exposição de 96 a 120 horas, observou-se significativa redução dos efeitos genotóxicos/mutagênicos da trifluralina (Figura 2 e 3) Os efeitos do resveratrol sobre a ação genotóxica e mutagênica da trifluralina podem ser decorrentes de uma atividade antioxidante, principalmente devido à habilidade aceptora de

radicais livres que danificam o DNA, como anteriormente demonstrado em própolis verde (ROBERTO 2009).

Os resultados obtidos pela avaliação do índice de germinação, demonstraram que também neste caso, houve efeito redutor do resveratrol sobre a ação inibitória da trifluralina e, este efeito foi proporcional à dose testada. A redução foi proporcional à concentração do resveratrol, até 1 ppm, após a qual não houve efeito adicional. A concentração de 1 ppm foi o valor tomado como referência a partir dos estudos *in vitro* de Carter (2014), que estudou o efeito sobre células bacterianas.

O ensaio com *Allium cepa*, permitiu confirmar os efeitos biológicos descritos para o resveratrol, quanto à sua atividade anti-mutagênica, corroborando com a vasta literatura existente onde atribui-se propriedades protetoras ao resveratrol (FISKEJÖ, 1985; WATERS, 1990; FERNANDES, 2005; MORENO, 2009; VENTURA-CAMARGO *et al.*, 2011).

5 CONCLUSÃO

Com relação à antimutagenicidade do resveratrol os resultados permitem concluir que o resveratrol desempenha um importante papel como mediador das atividades antimutagênicas, revertendo os efeitos tóxicos da trifluralina, possivelmente por proteger as células da atividade oxidante de radicais livres produzidos pela trifluralina (SARIGÖL *et al.*, 2018) Estes conhecimentos vêm corroborar com dados já existentes na literatura, bem como contribuir como subsídios a estudos complementares que contribuem com a indicação deste composto como adjuvante em terapias alternativas ou complementares.

Referências Bibliográficas

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

CABRERA G.L, RODRIGUEZ D.M.G. **Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant biossays**. Mutation Research, 19 de maio de 1999.

CARITÁ R & MARIN-MORALES MA. **Induction of chromosome aberrations in the Allium cepa test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes**; Chemosphere 72; p 722–725.2008

CARTER L.G.; D’ORAZIO J. A.; PEARSON K. J. **Resveratrol and Cancer: Focus on *In Vivo* Evidence**, Lexington, USA, p. 44, 2014. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24500760>>. Acesso em: 25 de maio de 2014.

CAVALCANTE, D.G.S.M. Avaliação dos efeitos genotóxicos e mutagênicos do roundup em peixes. 2008 88 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Unversidade Estadual de Londrina, Londrina. Disponível em:<
<http://www.uel.br/laboratorios/lefa/2008%20Dissertacao%20Dalita.pdf> >. Acesso em: 16 de outubro de 2016.

CHABNER, B. A.; LONGO, D. L. **Cancer chemotherapy and biotherapy**; 2a. ed., Lippincott-Raven:Filadélfia, 1996.

CUCHIARA C C, BORGES C S, BOBROWSKI VL. **Sistema teste de Allium cepa como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água**; Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária. João Pessoa; v.6, n.1; p.33-38.2012.

FERNANDES, T.C.C. **Investigação dos Efeitos Tóxicos, Mutagênicos e Genotóxicos do Herbicida Trifluralina, Utilizando Allium Cepa e Oreochromis Niloticus como Sistemas-Testes**. 2005 211 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro. Disponível em<
http://repositorio.unesp.br/bitstream/handle/11449/87698/fernandes_tcc_me_rcla.pdf?sequenc e=1&isAllowed=y> Acesso em: 15 de agosto de 2015.

FISKESJÖ G. **The Allium cepa test in wastewater monitoring**. Environmental Toxicology and Water Quality, v.8, p.291-298. 1993.

FISKESJÖ, G. **The Allium test as a standard in the environmental monitoring**. Hereditas, março de 1985, v.102 p 99 -112.

GADANO A, GURNI A, LÓPEZ P, FERRARO G, CARBALLO M. ***In vitro* genotoxic evaluation of the medicinal plant Chenopodium ambrosioides L.** J Ethonopharmacol, junho de 2002.

GRANT, W.F. **The present status of higher plant biossays for detection of environmental mutagens**. Mutation Research, 16 de outubro de 1994.

LOUREIRO, A. P. M; MEDEIROS, M.H.G. **Formação de Adutos Exocíclicos com Bases de Dna: Implicações em Mutagênese e Carcinogênese**. Quim. Nova, vol. 25, nº. 5, p 777.

MA, T. H.; Xu, Z.; Xu, C; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G.A.; Zhang, H. **The improved Allium/Vicia root tip micronucleous assay for clastogenicity of enviromental pollutants**. Mutation Research, abril de 1995.

MAZZEO D. E.; LEVY C. E.; DE ANGELIS D. F.; MARIN-MORALES M. A. **BTEX biodegradation by bacteria from effluents of petroleum refinery.** *Sci Total Environ*, 15 de setembro de 2010.

MORGANO, M. A.; FARIA, C. G.; FERRÃO, M. F. *et al.* **Determination of protein in raw coffee for NIR spectroscopy and regression PLS.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.25, n.1, p.25-31, 2005.

ODIN, A. P. **Vitamins as antimutagens: advantages and some possible mechanisms of antimutagenic action.** *Mutation Research*, v.386, pp.39-67, 1997.

ROBERTO, M.M. **Avaliação do Potencial Antimutagênico de Extrato Etanólico Própolis Verde e de Baccharis Dracunculifolia (Asteraceae), por Meio de Sistema-Teste de *Allium Cepa* e Células de Mamíferos (Htc).** 2009 116f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2009. Disponível em:< <http://repositorio.unesp.br/handle/11449/87737>> Acesso em 08 de setembro de 2015.

SARIGÖL K. Z, AYDIN S, ÜNDEĞER B. Ü. BAŞARAN. N. **In vitro genotoxicity assessment of dinitroaniline herbicides pendimethalin and trifluralin.** *Food Chem Toxicol.* vol.113, 2018 Mar; 113p.90-98. doi: 10.1016/j.fct.2018.01.034. Epub, 2018 Jan 31.

SILVA J, ERDTMANN B, PEG, J.A. **Genética toxicológica.** 1 ed. Porto Alegre:1 Ed. Alcance, 2003.

SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J.A.P. **Genética toxicológica.** Porto Alegre, Alcance, 2003, 422p.SOUZA, F.G. **Atividade Antimutagênica e Citotóxica da β -glicana de *Agaricus brasiliensis* dependente da MAPK p 38.** 2007, 72f. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Molecular) Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007. Disponível em:< <http://www.lume.ufrgs.br/handle/10183/13590>> Acesso em 08 de setembro de 2015.

SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. **Cancer and cell cycle-specific and cell cycle nonspecific anticancer.** Em *Oncology*; Jonhston, P. G., ed; Oxford.University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132;

VARANDA, E.A. **Atividade mutagênica de plantas medicinais.** *Rev. Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada*, vol. 27, nº 1, p 1-7,2006.

VENTURA-CAMARGO, B.C.; MALTEMPI, P.P.P.; MARIN-MORALES, A. The use of the Cytogenetic to Identify Mechanisms of Action of an Azo Dye in *Allium Cepa* Meristematic Cells.*environmental & Analytical Toxicology*, 29 de novembro de 2011.

ⁱ Graduação em Engenharia de Alimentos pelo Centro Universitário da Fundação Educacional Barretos.

ⁱⁱ Graduação em Farmácia pela Universidade de São Paulo; Mestrado em Ciências Biológicas pela Universidade Estadual de Campinas; Doutorado em Anatomia Patológica pela Universidade Estadual de Campinas; Pós-doutorado em Toxinologia pela Universidade Estadual de Campinas. E-mail para contato: silvia.pierre@hotmail.com