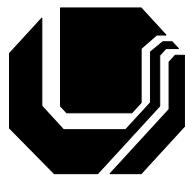


UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO E GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do efeito carcinogênico de edulcorantes por
meio do teste para detecção de clones de tumores
epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster***

Aluna: Mirley Alves Vasconcelos

UBERLÂNDIA - MG
2016



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO E GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA

**Avaliação do efeito carcinogênico de edulcorantes por
meio do teste para detecção de clones de tumores
epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster***

Aluna: Mirley Alves Vasconcelos

Orientador: Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. Priscila Capelari Orsolin

Dissertação apresentada à Universidade Federal de Uberlândia como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Genética e Bioquímica (Área de concentração: Genética)

UBERLÂNDIA - MG
2016

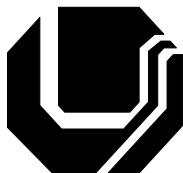
Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

V331a
2016

Vasconcelos, Mirley Alves, 1979
Avaliação do efeito carcinogênico de edulcorantes por meio do teste
para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) em *Drosophila*
melanogaster / Mirley Alves Vasconcelos. - 2016.
86 f. : il.

Orientador: Júlio César Nepomuceno.
Coorientadora: Priscila Capelari Orsolin.
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.
Inclui bibliografia.

1. Genética - Teses. 2. Adoçantes - Teses. 3. *Drosophila*
melanogaster - Teses. 4. Tumores - Teses. I. Nepomuceno, Júlio César.
II. Orsolin, Priscila Capelari, 1986. III. Universidade Federal de
Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. IV.
Título.



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO E GENÉTICA E BIOQUÍMICA
PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Avaliação do efeito carcinogênico de edulcorantes por
meio do teste para detecção de clones de tumores
epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster***

ALUNO: Mirley Alves Vasconcelos

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Examinadores: Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti
Prof. Dr. Bruno Lassmar Bueno Valadares

Data da Defesa: 29/07/2016

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas.

Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno (*in memorian*)

Prof. Dr. Mário Antônio Spanó

Dedico este trabalho ao meu marido
Hélio Alves Pereira e à minha filha
Yasmin Alves Vasconcelos, pelo
companheirismo, confiança e incentivo.
Vocês são a minha maior riqueza.
Dedico também ao meu saudoso
orientador **Prof. Dr. Júlio César**
Nepomuceno. A você, professor, a
minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** e a minha **Nossa Senhora Aparecida** por estarem sempre me abençoando, colocando em meu caminho oportunidades e pessoas que foram fundamentais na conquista desse sonho que parecia ser tão distante.

Aos meus pais, **José Tomaz de Vasconcelos e Roméria das Dores Oliveira Vasconcelos**, pela educação a mim destinada. Vocês foram fundamentais na construção do meu caráter e da pessoa que sou hoje.

Ao meu marido, **Hélio Alves Pereira**, pela confiança, incentivo, dedicação e companheirismo incondicional. Obrigada pela valiosa ajuda nos meus momentos da minha ausência, principalmente, no que se refere aos cuidados destinados à nossa filha. A você meu amor eterno.

À minha filha, **Yasmin Alves Vasconcelos**, pelo carinho, docura, compreensão e alegria. É por você, minha filha, que busco a cada dia ser uma pessoa melhor. Minha jóia preciosa.

Ao meu saudoso e eterno orientador, **Prof. Dr. Júlio César Nepomuceno**, que sempre acreditou em minha capacidade e me acolheu, como sua aluna, em um momento tão difícil. Obrigada pela abertura das portas do meio acadêmico, pela valiosa contribuição ao meu trabalho e pelos preciosos ensinamentos que, como sua discípula, levarei por toda minha caminhada. Obrigada pelo exemplo de profissional e ser humano que você foi.

À minha co-orientadora, **Prof^a. Dr^a. Priscila Capelari Orsolin**, pela imensurável contribuição ao meu trabalho, pela disponibilidade em sempre ajudar e por ter me recebido, como sua orientanda, em um momento tão decisivo do mestrado. Para mim é uma grande satisfação tê-la como minha co-orientadora. Hoje você é uma excelente profissional e em tempos atrás era uma excelente aluna.

Ao meu segundo orientador, **Prof. Dr. Mário Antônio Spanó**, pela sensibilidade em me assumir como sua orientanda nesta reta final do mestrado, mostrando, acima de tudo, imensa generosidade e nobreza.

A todos os meus colegas do Laboratório de Citogenética e Mutagênese, em especial, à **Nayane Moreira Machado** e à **Rosiane Gomes da Silva Oliveira**, pela grandeza em compartilhar seus conhecimentos.

Aos membros da banca examinadora, **Prof^a. Dr^a. Ana Maria Bonetti** e **Prof. Dr. Bruno Lassmar Bueno Valadares**, por terem aceitado tão gentilmente o convite e pelas sugestões destinadas a este trabalho.

Aos professores do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, pela relevante contribuição científica ao longo deste curso.

À secretaria do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica, **Janaina de Souza Mota**, pelo grande empenho e boa vontade em sempre ajudar quando solicitada.

Ao **Dr. Ulrich Graf** (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland) pelo fornecimento da linhagem mutante *multiple wing hairs* de *Drosophila melanogaster*.

Ao **Bloomington Drosophila Stock Center**, da Universidade de Indiana nos Estados Unidos (USA), pelo fornecimento da linhagem mutante *wts* de *Drosophila melanogaster*.

APOIO FINANCEIRO

Esta pesquisa foi inteiramente desenvolvida no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM em Patos de Minas/MG.

Recebemos apoio financeiro dos seguintes Órgãos e Instituições:

- Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM;
- Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq;
- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Nível Superior- CAPES;
- Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais- FAPEMIG;
- Governo do Estado de Minas Gerais através da Secretaria de Estado de Educação – SEE/MG;
- Universidade Federal de Uberlândia – UFU.

LISTA DE ABREVIATURAS

- AMP: Adenosina monofosfatada
- AMPK: Quinase dependente de adenosina monofosfato
- AS: Aspartame
- ATP: Adenosina Trifosfato
- CA: Aberração cromossômica
- CA IX: Metaloenzima anidrase carboxilases IX
- CaSac: Sacariana de cálcio
- CAT : Catalase
- CAS: Registro de produtos químicos
- 4-CG: Cloro-4-desoxi-D-galactose
- CHL: Sub-linhagem de fibroblastos derivados de pulmão de roedores
- CYP 3A: Citocromo P3A
- CYP 450: Citocromo P450
- 1,6-DCF: 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-D-frutose
- DM-PK: Proteína quinase distrofia miotónica
- DNA: Ácido Desoxirribonucléico
- D.O.U: Diário Oficial da União
- DXR: Cloridrato de Doxorrubicina
- EFSA: European Food Safety Authority- Autoridade Européia de Segurança dos Alimentos
- FAO: Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação
- FDA: Food and Drug Administration
- Fe: Ferro
- FER: Fundação Européia Ramazzini em Oncologia e Ciências do Ambiente
- FORWARD: Teste de Mutação
- g: Grama
- G₂/M: Última fase da interfase, antes do início da mitose
- g/mol: grama por mol
- GR: Glutationa Redutase
- GRAS: Geralmente Reconhecido como Seguro
- GSH: Glutationa Reduzida

HCT116: Linhagem celular do carcinoma colorretal humano
HeLa: Linhagem derivada de células obtidas de um câncer cervical
Hsac: Sacarina ácida
IBGE: Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IDA: Ingestão Diária Aceitável
INCA: Instituto Nacional do Câncer
JECFA : The Joint Expert Committee on Food Additives - Comitê Misto de Peritos em Aditivos Alimentares
KCAL: Quilocalorias
Kg: Kilograma
Ksac: Sacarina de potássio
LATS1: Gene supressor de tumor em mamíferos
LDL: Lipoproteína de baixa densidade
LKB1: Proteína quinase-serina-treonina 11
M: Molar
mg: Miligrama
MiaPaCa-2: Linhagem celular do carcinoma pancreático humano
mM: Milimolar
mTOR: Mammalian target of rapamicin – Mamíferos alvo da rapamicina
mwh: *Multiple wing hairs* – Múltiplos pelos nas asas
NaSac: Sacarina sódica
NFkB: Nuclear transcription factor K – Fator K de transcrição nuclear
p53: Fator de transcrição
PC12: Linhagem de adrenais de ratos
pH: Potencial de hidrogênio
PFA: Prevention of Food Adulteration - Prevenção de Adulteração de Alimentos
P-gp: P-glicoproteína
PTEN: Homólogo de fofostase e tensina
ROS: Espécies reativas de oxigênio
Sac: Sacarina
Sb: mutação dominante *stubble*
SCF: Comitê Científico dos Alimentos
SG: Glicosídeo de esteviol

SMART: Teste para detecção de Mutação e Recombinação Somáticas

SOD: Superóxido-dismutase

Sucra: Sucralose

TA97: Cepas de bactérias *Salmonella typhimurium*

TA100: Cepas de bactérias *Salmonella typhimurium*

TBARS: Ácido tiobarbitúrico

TK6: Linhagem de células linfoblastoides humanas

TM3,Sb¹: Cromossomo balanceador

TSC: Complexo Esclerose Tuberosa

UNIPAM: Centro Universitário de Patos de Minas

UMU: Ensaio com e sem ativação metabólica

US FDA: United States Food and Drug Administration

ZYXIN: Componente de adesão focal no aparelho mitótico

WHO: World Health Organization - Organização Mundial de Saúde

Warts: Verrugas ou tumor epitelial

wts: Gene supressor de tumor

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Frequências de clones de tumores observadas em <i>Drosophila melanogaster</i> , heterozigota para o gene supressor de tumor <i>Wts</i> , tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), controle negativo (água) e com diferentes concentrações de aspartame (AS) (0,85; 1,7; 3,4; 6,8 e 13,6mM).....	64
Tabela 2. Frequências de clones de tumores observadas em <i>Drosophila melanogaster</i> , heterozigota para o gene supressor de tumor <i>Wts</i> , tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), controle negativo (água) e com diferentes concentrações de sucralose (Sucra) (0,5; 1,25; 2,5; 5,0 e 10mM).....	65
Tabela 3. Frequências de clones de tumores observadas em <i>Drosophila melanogaster</i> , heterozigota para o gene supressor de tumor <i>Wts</i> , tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), controle negativo (água) e com diferentes concentrações de sacarina sódica (Sac) (25; 50; 100; 200 e 400mM).....	66
Tabela 4. Frequências de clones de tumores observadas em <i>Drosophila melanogaster</i> , heterozigota para o gene supressor de tumor <i>Wts</i> , tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), controle negativo (água) e com diferentes concentrações de glicosídeo de esteviol (SG) (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0mM).....	67

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1

Figura 1.1. Fases da Carcinogênese: iniciação, promoção e progressão...	5
Figura 1.2. Vias metabólicas de mTOR e AMPK.....	7
Figura 1.3. Ativação e atuação da via de sinalização NFkB.....	8
Figura 1.4. Classificação dos edulcorantes.....	10
Figura 1.5. Estrutura química do aspartame	11
Figura 1.6. Hidrólise do Aspartame.....	12
Figura 1.7. Estrutura química da sucralose	14
Figura 1.8. Estrutura química do 4-cloro galactose (à esquerda) e 1,6-dicloro frutose (à direita).....	16
Figura 1.9. Estrutura química da sacarina sódica.....	17
Figura 1.10. <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i>	20
Figura 1.11. Estruturas químicas do Esteviosídeo (à direita) e Rebaudiosídeo A (à esquerda).....	21
Figura 1.12. Estrutura química do Esteviol.....	22
Figura 1.13. Casal de <i>Drosophila melanogaster</i>	24
Figura 1.14. Ciclo reprodutivo da <i>Drosophila melanogaster</i>	25
Figura 1.15. Larva de <i>Drosophila melanogaster</i> com discos imaginais. Boca (mh), discos imaginais dos olhos (ed); discos imaginais das asas (wd); discos imaginais das pernas (ld); discos imaginais das antenas (ad); cérebro (b); gônadas (gd); nervo (Bn) e talo óptico (os).....	26
Figura 1.16. Expressão de tumor epitelial em <i>Drosophila melanogaster</i> . Na asa (16A), no corpo (16B) e na perna (16C).....	27
Figura 1.17. Fórmula estrutural da Doxorrubicina.....	29
Figura 1.18. Esquema simplificado da interação da Doxorrubicina (DXR) com tumores em células cardíacas.....	30

CAPÍTULO 2

Figura 2.1. Fórmula estrutural do aspartilfenilalanina-1-metiléster.....	47
Figura 2.2. Fórmula estrutural do 4,1,60-triclorogalactosacarose.....	48
Figura 2.3. Fórmula estrutural da sacarina sódica.....	48
Figura 2.4. Fórmula estrutural do Esteviosídeo (à direita) e Rebaudiosídeo A (à esquerda).....	49
Figura 2.5. Fórmula estrutural do Cloridrato de Doxorrubicina.....	50
Figura 2.6. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose de larvas de 72h, tratadas isoladamente com DXR (0,4mM) e diferentes concentrações de aspartame.....	53
Figura 2.7. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose de larvas de 72 h, tratadas isoladamente com DXR (0,4mM) e diferentes concentrações de sucralose.....	54
Figura 2.8. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose de larvas de 72h, tratadas isoladamente com DXR (0,4mM) e diferentes concentrações de sacarina sódica.....	55
Figura 2.9. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose de larvas de 72h, tratadas isoladamente com DXR (0,4mM) e diferentes concentrações de glicosídeo de esteviol.....	56

SUMÁRIO

APRESENTAÇÃO.....	1
CAPÍTULO 1- FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	3
1.1 DIETA E CÂNCER.....	4
1.2 EDULCORANTES.....	9
1.2.1 Aspartame.....	11
1.2.2 Sucralose.....	14
1.2.3 Sacarina Sódica.....	17
1.2.4 Glicosídeo de Esteviol.....	19
1.3 <i>Drosophila melanogaster</i>	24
1.4 DOXORRUBICINA	29
REFERÊNCIAS.....	31
CAPÍTULO 2	42
RESUMO.....	43
ABSTRACT.....	44
1. INTRODUÇÃO.....	45
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	46
2.1 Agentes químicos.....	46
2.1.1 Aspartame.....	46
2.1.2 Sucralose.....	47
2.1.3 Sacarina sódica.....	48
2.1.4 Glicosídeo de esteviol.....	49
2.1.5 Doxorrubicina.....	49
2.2 Teste para detecção de tumores epiteliais em <i>Drosophila melanogaster</i>	50
2.2.1 Linhagens, estoque, cruzamento e tratamento.....	50
2.2.2 Análise das moscas.....	51
2.2.3 Análise estatística.....	52
3. RESULTADOS.....	52
4. DISCUSSÃO.....	56
REFERÊNCIAS.....	68

APRESENTAÇÃO

As diferentes espécies desenvolvem um comportamento alimentar peculiar, advindo das suas necessidades nutricionais e da sua capacidade de detecção dos sabores. Esta detecção se dá por ação de receptores gustativos, onde aqueles responsáveis pelo gosto adoçicado permitem o desenvolvimento de uma preferência natural dos seres humanos ao sabor doce (WANG et al., 2004). Este fato pode ser comprovado por dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), o qual menciona que, nos últimos 35 anos, houve redução do consumo de alimentos tradicionais, como o arroz e o feijão e aumento no consumo de alimentos industrializados, como refrigerantes (IBGE, 2010).

Pesquisas de aquisição de gêneros alimentícios mostram que, desde a década de 1990, houve uma crescente venda de alimentos processados e ultraprocessados em países de renda média, como o Brasil (MONTEIRO, 2013). Relatos como este justificam a intensa atividade da indústria em produzir alimentos com larga utilização de aditivos (LOK et al., 2010).

No mundo todo já foram aprovados mais de 3000 aditivos (YILMAR e UÇAR, 2014), que são classificados em conservantes, edulcorantes, aditivos de cor, intensificadores de sabor e emulsionantes. Destes, os adoçantes estão inseridos no grupo dos edulcorantes e merecem atenção especial.

Os adoçantes podem ser nutritivos e não nutritivos, naturais ou sintéticos. Destes aditivos os mais consumidos são os não calóricos, destacando-se o aspartame, a sucralose, a sacarina sódica e o glicosídeo de esteviol; os quais tiveram seus consumos aprovados no Brasil, pela Lei 8918 de 14 de Julho de 1994 (BRASIL, 1994).

Estas substâncias, por serem facilmente encontradas em alimentos, são intensamente consumidas durante toda a vida. Este fato justifica o desenvolvimento de estudos com o propósito de obter dados que avaliem a genotoxicidade e a carcinogenicidade destas substâncias. Tais dados são obtidos pela Food and Drug Administration (FDA) (CHUNG e LEE, 2013).

A WHO relata que o desenvolvimento do câncer está associado, dentre outros fatores, à genotoxicidade (WHO, 2011), uma vez que os danos ao ácido desoxirribonucléico (DNA) acarretam o aparecimento de aberrações

cromossômicas e alterações de bases, que são responsáveis por mudanças no ciclo celular (JORDE et al., 2010). De acordo com as últimas estatísticas divulgadas pela WHO, as neoplasias acometeram cerca de 1,6 milhão de pessoas entre os anos de 2000 e 2012 em todo o mundo (WHO, 2014). No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) revela que, as estimativas para o biênio 2016-2017 são de 234.010 novos casos de câncer, sendo os maiores valores para para o câncer de próstata, seguido do câncer de mama (INCA, 2016).

Conforme mencionado, os adoçantes sempre foram alvo de estudos para avaliação da genotoxicidade, a qual pode apresentar associação direta ou indireta à carcinogênese. A obtenção de resultados inconclusivos e contraditórios tende a incentivar a realização de novos ensaios que contemplem os princípios da genética toxicológica. Diante deste fato, o presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo de avaliar o potencial carcinogênico dos adoçantes aspartame, sucralose, sacarina sódica e glicosídeo de esteviol por meio do teste de detecção de clones de tumores epiteliais (*wts*) em *Drosophila melanogaster*.

Este trabalho encontra-se estruturado da seguinte maneira:

No capítulo I encontra-se a fundamentação teórica, com informações que justificam a escolha deste tema para o desenvolvimento desta pesquisa. Inicialmente é realizada uma abordagem associando a nutrição com o aparecimento do câncer. Em seguida, aborda-se um apanhado histórico do desenvolvimento e a aprovação do consumo dos edulcorantes aspartame, sucralose, sacarina sódica e glicosídeo de esteviol, bem como suas características bioquímicas. Posteriormente, é relatada a importância do uso da *Drosophila melanogaster* como organismo modelo em pesquisas que avaliem o potencial carcinogênico de substâncias. Este relato vem associado ao teste de detecção de tumores em clones de células epiteliais. Finalizando, foi apresentado o mecanismo de ação da droga quimioterápica Doxorrubicina no desenvolvimento de tumores, justificando sua utilização como controle positivo desta pesquisa.

O capítulo II traz o artigo intitulado “Avaliação do potencial carcinogênico de edulcorantes por meio do teste de detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*” que, posteriormente, será enviado para publicação no periódico Food and Chemical Toxicology.

CAPÍTULO I

FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

1.1 DIETA E CÂNCER

O ser humano preza muito por uma saborosa alimentação, na intenção de vivenciar momentos prazerosos. Porém, muitas vezes os alimentos que oferecem uma ótima sensação no quínto sabor nem sempre oferecem um bom resultado para a saúde. Para Wicki e Hagmann (2011), a incidência do câncer está intimamente relacionada à uma alimentação inadequada. Sendo assim, a mudança no comportamento alimentar pode reduzir o número de pacientes com câncer.

As células cancerosas são originadas a partir de desordem genética e/ou irregularidades metabólicas (D'ASCENZIO et al., 2014). Estas alterações celulares podem ser resultantes de mecanismos epigenéticos e/ou mudanças na constituição ou na estrutura do genoma, através de substituição de nucleotídeos, inserções, deleções, rearranjos e alterações no número de cópias de genes (PLEASANCE et al., 2010).

No último século, estratégias vem sendo desenvolvidas com o propósito de detecção dessas mutações no genoma de células cancerígenas. Stratton et al. (2009) mencionam que cerca de 400 genes já foram identificados e que, através dessas alterações somáticas nestes genes, ocorre o crescimento clonal determinando a oncogênese.

As alterações ocorridas no genoma modificam o ciclo celular induzindo a formação de neoplasias, que são massas celulares, também conhecidas como tumores, podendo ser localizados em tecidos e órgãos (JORDE et al., 2010). A carcinogênese possui etapas que permitem a instalação do tumor, são elas: (i) iniciação, na qual o agente carcinogênico induz alterações genéticas permanentes nas células; (ii) promoção, a célula inicial é estimulada a proliferar, amplificando o clone transformado e (iii) progressão, onde o clone transformado prolifera, o tumor cresce, surgem células com potencial metastatizante e a neoplasia se desenvolve em sítios distantes da sua origem, como mostrado na Figura 1.1 (BRASILEIRO FILHO, 2013).

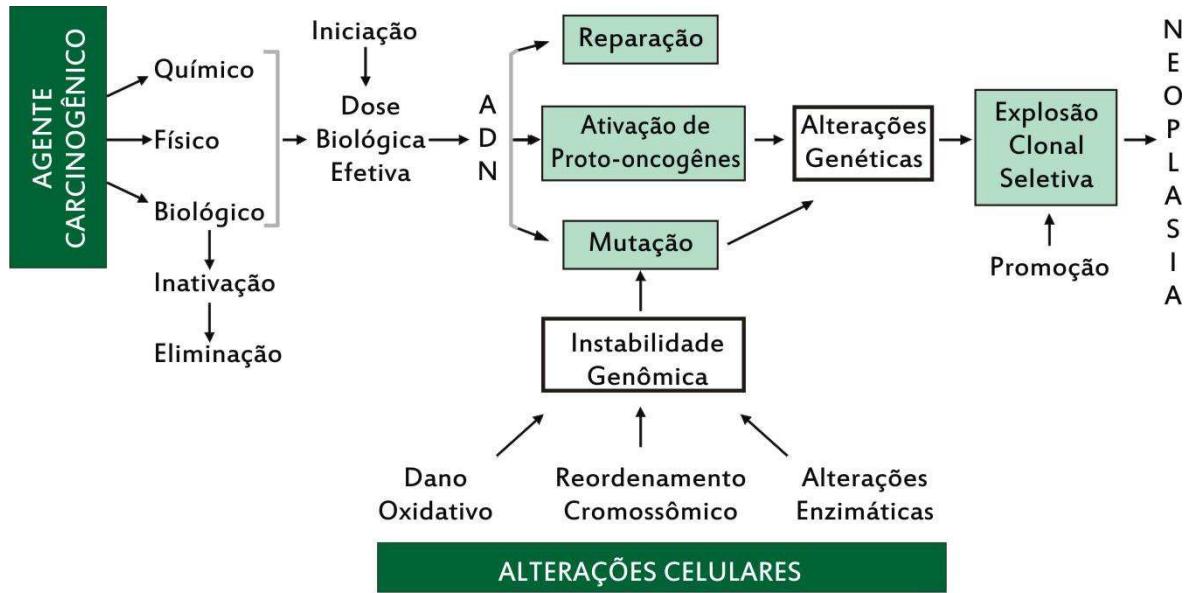


Figura 1.1. Fases da Carcinogênese: iniciação, promoção e progressão.

Fonte: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAGJ1oAG/enfermagem-oncologia-01?part=3> - Acesso: 20/07/2016.

O câncer é determinado pelo acúmulo de mutações que ocorrem no DNA ao longo dos tempos e que influenciam no índice mitótico (NELSON e COX, 2014). O ciclo celular relacionado às neoplasias é regulado por vários genes, dentre eles: (i) os proto-oncogenes que codificam proteínas, denominadas fatores de crescimento, que induzem células em repouso a se dividirem e em alguns casos a se diferenciarem; (ii) os genes supressores de tumor, que codificam proteínas que, normalmente, restrigem a divisão celular e (iii) os genes de reparo de danos ao DNA, que impedem o acúmulo de mutações ao longo dos tempos (NELSON e COX, 2014). Não menos importantes nesta regulação estão os genes apoptóticos e antiapoptóticos (BRASILEIRO FILHO, 2013). Diante da atuação dos agentes mutagênicos, estes genes deixam de desempenhar suas funções na regulação do ciclo celular (GRIFFITHS et al., 2008).

Os proto-oncogenes ao passarem por mutações, desencadeadas pela ação de agentes físicos e/ou químicos, passam a ser chamados de oncogenes (AMENDOLA e VIEIRA, 2005).

Os genes supressores de tumor, ao contrário dos oncogenes, precisam ter dois alelos afetados para induzir o câncer, caracterizando um caráter recessivo. Em geral, a perda de uma cópia do gene decorre de mutação,

enquanto a segunda cópia é perdida por deleção do outro alelo (BRASILEIRO FILHO, 2013).

Os genes de reparo, quando inativos, deixam uma parte do genoma sem reparo ou realizam um reparo incompleto; fatores dietéticos e mutagênicos comprometem a reparação dos genes (FERGUSON, 2010).

A proliferação celular descontrolada, que representa a essência da doença neoplásica, envolve não só a desregulação nos mecanismos de proliferação celular, mas também ajustes do metabolismo energético, a fim de estimular o crescimento e divisão celular (EL-BACHA e SOLA-PENNA, 2003). Para ocorrer o bom funcionamento do ciclo celular é necessário haver um metabolismo energético equilibrado. Diante deste fato, as pesquisas envolvendo causas e tratamento de câncer enfatizam este metabolismo, tendo em vista que ocorre grande interação entre câncer e metabolismo (D'ASCENZIO et al., 2014). Além disso, deve-se considerar que a condição proliferativa de uma célula tumoral requer uma reprogramação metabólica da célula, de maneira a satisfazer suas demandas energéticas. A modificação mais conhecida no metabolismo energético das células tumorais é a capacidade glicolítica aumentada, mesmo na presença de altas concentrações de oxigênio (ZHOU et al., 2010).

Em 1924, Warburg relatou que as células cancerígenas conseguem grande parte de Adenosina Trifosfato (ATP) a partir da glicólise aeróbica, sendo um processo onde ocorre a degradação da glicose, liberando moléculas de lactato, mesmo na presença de suficiente oxigênio (WARBURG, 1924). Em células normais, a produção de grande parte do ATP ocorre com a oxidação do piruvato no interior das mitocôndrias, mas em comparação com o saldo de ATP obtido com a glicólise nas células cancerígenas, a quantidade de ATP produzida nas mitocôndrias passa a ser considerada reduzida (WICKI e HAGMANN, 2011). Estes mesmos autores mencionaram que, a princípio, acreditava-se que a glicólise aeróbica ocorreria devido à defeitos mitocôndriais. Porém, só foi verificado defeito em alguns casos de tumor.

Mahon et al. (2015) relataram que o tumor sólido encontra-se em um microambiente letal, no qual a condição de hipóxia é tida como um quadro de stress para as células tumorais. Diante deste fato, ocorre uma reprogramação metabólica, na qual as células substituem o metabolismo aeróbico por glicólise

fermentativa (WARBURG, 1956). Nesta condição ocorre redução do potencial de hidrogênio (pH) e processo de acidificação, no qual o pH intracelular permanece em nível fisiológico, porém o pH extracelular se torna acidificado, gerando um quadro de pH diferencial, que é considerado prejudicial à célula tumoral (MAHON et al., 2015). A atuação das enzimas anidrase carbônica XII e IX modula o pH diferencial nestas células, garantindo sua sobrevivência (D'ASCENZIO et al., 2014).

Wicki e Hagmann (2011) relataram que nas reações metabólicas verifica-se a ação de sensores energéticos, que trabalham de maneira antagônica, (Figura 1.2): (i) mamíferos alvo da rapamicina (mTOR), enzima serina-quinase, responsável por estimular processos anabólicos que consomem ATP para desempenho de funções como crescimento celular, síntese protéica e lipídica e (ii) quinase dependente de adenosina monofosfato (AMPK) atuando de maneira oposta ao mTOR, estimulando processos catabólicos na mitocôndria e produzindo ATP. O sensor mTOR é estimulado diante de altos níveis de transportadores de energia e o AMPK responde a aumento de adenosina monofosfatada (AMP).

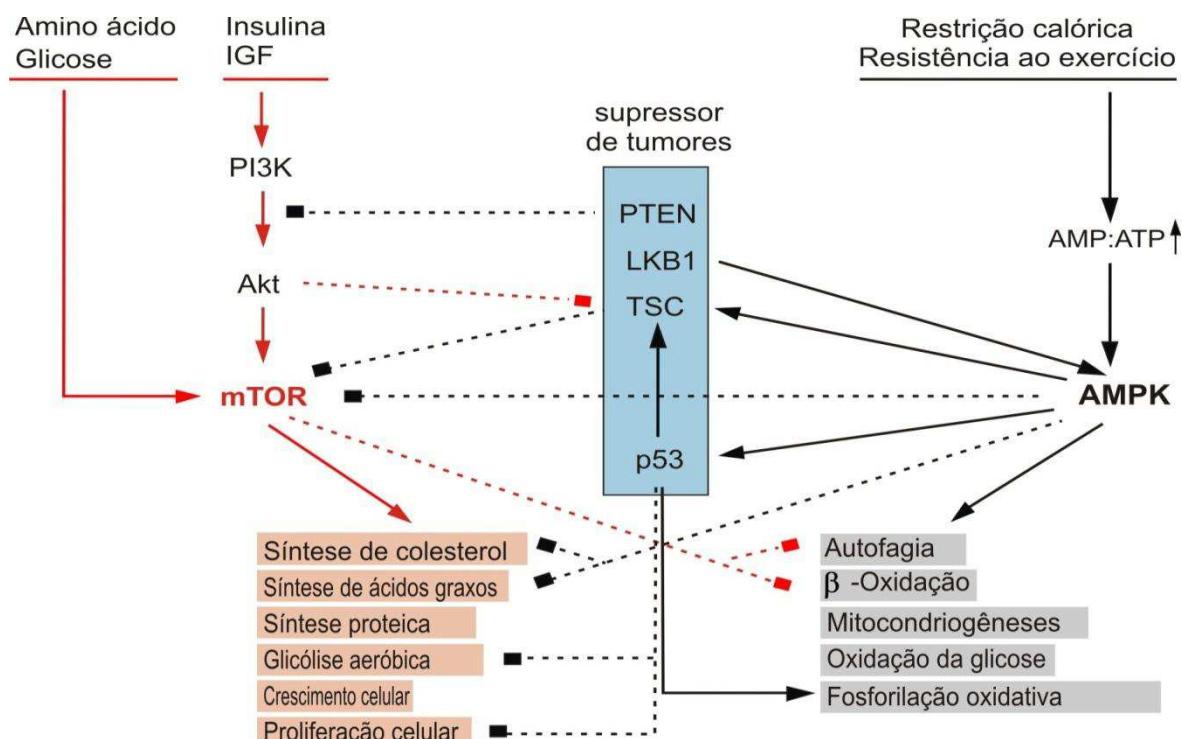


Figura 1.2. Vias metabólicas de mTOR e AMPK.

Fonte: Adaptação de WICKI e HAGMANN (2011).

Estas duas vias são ativadas em situações opostas, onde uma inibe a outra. Nestas vias metabólicas existem quatro compostos intermediários que atuam como supressores de tumor inibindo mTOR; são eles: Homólogo de fofase e tensina (PTEN), Proteína quinase-serina-treonina11(LKB1), Complexo Esclerose Tuberousa (TSC) e Fator de transcrição (p53). A atividade de mTOR a longo prazo gera carcinogênese, embora esta não seja a única causa de uma síndrome metabólica geradora de tumor (WICKI e HAGMANN, 2011).

Estas informações vêm ao encontro do trabalho de Calle e Kaaks (2004), que mencionam a atuação da adipocina inflamatória, liberada pelo tecido adiposo visceral, favorecendo formação de tumores. Estas moléculas e seus metabólitos influenciam na sinalização oncogênica, como a oxidação da lipoproteína de baixa densidade (LDL) que promove a transformação celular por meio da via de sinalização do fator K de transcrição nuclear (NFkB) (Figura 1.3) (HIRSCH et al., 2010), além de contribuir para a expressão da monoacilglicerol lipase, que atua aumentando a migração, invasão e sobrevivência de células do câncer (NOMURA et al., 2010).

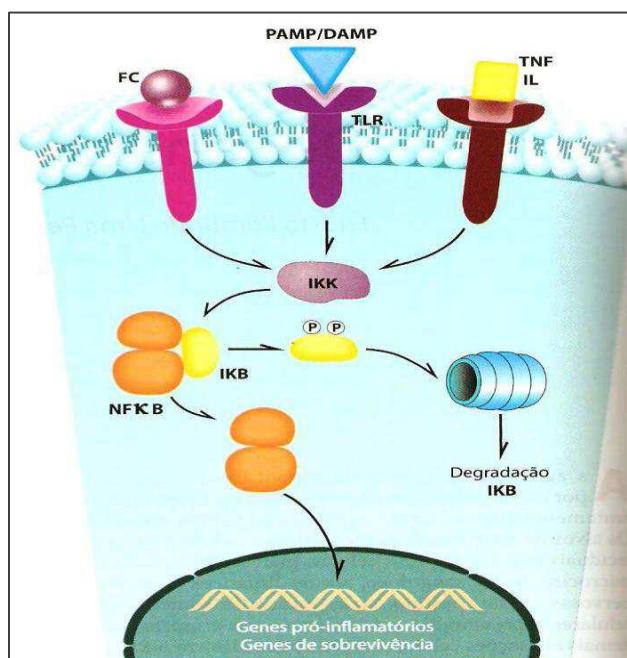


Figura 1.3. Ativação e atuação da via de sinalização NFkB.
Fonte: BRASILEIRO FILHO (2013).

Fica evidente que a obesidade representa uma influência limitada, mas real, para o desenvolvimento do câncer e mortalidade, tendo em vista que esta doença é considerada crônica e tem seu desenvolvimento após muitos anos de alimentação inadequada (BASEN-ENGQUIST e CHANG, 2011).

A dieta cetogênica, desenvolvida em animais de laboratório, vem sendo utilizada como uma forma de terapia para redução de tumores. Esta proposta consiste na ingestão reduzida de carboidratos acompanhada de um enriquecimento de lipídeos, com efeitos bioquímicos e biológicos que são ocasionados pela redução de calorias (MAALOUF et al., 2009). A restrição calórica decorrente da reduzida exposição celular à glicose, favorece o estado metabólico AMPK e inibe o tempo de atividade da via mTOR, reduzindo a formação de tumores (WICKI e HAGMANN, 2011).

Estes argumentos fortalecem a influência da alimentação no desenvolvimento de neoplasias, seja atuando como agentes químicos mutagênicos ou em vias de sinalização que contribuem para um metabolismo irregular, com tendência para ativação de vias de sobrevivência de células tumorais. Esta relevância se enquadra, principalmente, aos alimentos que, pela sua facilidade de aquisição, são bastante consumidos pela população, sejam eles naturais ou industrializados como, por exemplo, os edulcorantes.

1.2 EDULCORANTES

Verifica-se, há décadas, uma motivação para a indústria desenvolver alimentos dietéticos que substituam o açúcar, visando atender as necessidades dietoterápicas específicas como exigências físicas, metabólicas, fisiológicas e patológicas (ROSSONI et al., 2007).

Para a substituição da sacarose, açúcar de mesa, desenvolveram-se os adoçantes dietéticos, que são edulcorantes sem adição de monossacarídeos ou dissacarídeos. Estes adoçantes são encontrados em alimentos como balas, goma de mascar, adoçantes de mesa, sucos, refrigerantes, chás, dentre outros. Isso justifica a facilidade e o acesso para o consumo destes aditivos, que pode ser feito não só por pessoas que apresentam algum distúrbio na saúde, mas

também por pessoas que estão preocupadas apenas em manter a forma física (TELLES, 1991).

Os edulcorantes podem ser calóricos, como carboidratos e peptídeos, e não-calóricos (Figura 1.4), sendo estes os mais consumidos incluindo, dentre outros, o aspartame, a sucralose, a sacarina sódica e o glicosídeo de esteviol. Estes apresentam um potencial de doçura mais elevado em relação ao açúcar de mesa, além de não causarem diarreia osmótica e serem encontrados nos alimentos de forma combinada, evitando assim o seu consumo excessivo (TANZER, 1995).

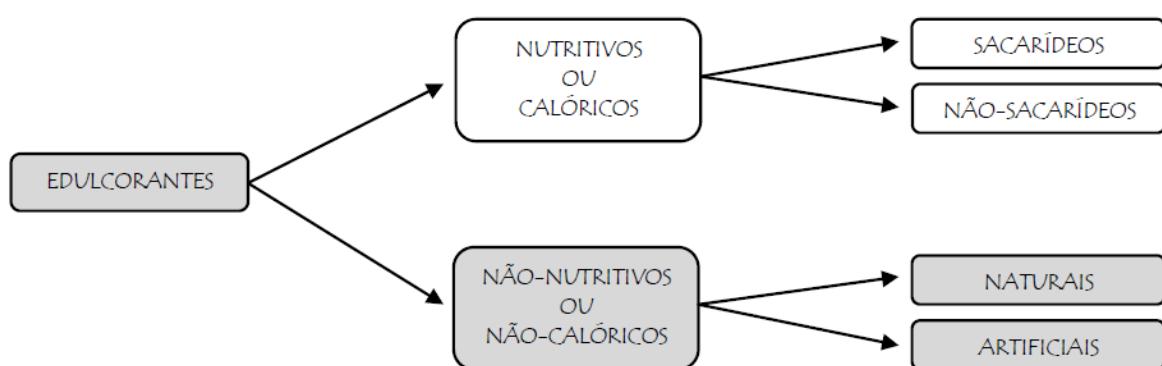


Figura 1.4. Classificação dos edulcorantes.

Fonte: ZANINI (2010).

Atualmente, é fácil o acesso a esses adoçantes. A Legislação Brasileira proibiu, durante quinze anos (1973 a 1988), o desenvolvimento de produtos dietéticos, os quais poderiam ser encontrados apenas em farmácias e comercializados como medicamentos de tarja vermelha e sob receita médica (ROSSONI et al., 2007). Posteriormente, o Ministério da Saúde, através da resolução nº 04 de 24/11/1988, publicada no Diário Oficial da União (D.O.U) em 19/12/1988, orientou o uso de aditivos intencionais nos alimentos e bebidas dietéticas, com as devidas concentrações nos produtos (BRASIL, 1988). Em 1994, a Lei 8918, publicada no D.O.U em 15/07/1995, estabeleceu a obrigatoriedade do registro de padronização, classificação, inspeção, fiscalização da produção e do comércio de bebidas em todo o território nacional. No artigo sétimo desta Lei verifica-se a regulamentação de edulcorantes naturais e sintéticos na elaboração de bebidas dietéticas (BRASIL, 1994).

Até a década de noventa o cenário era de grande resistência, exercida pela Legislação Brasileira, em aceitar os produtos dietéticos para maior acesso à população, mesmo havendo necessidades orgânicas, porém, esta resistência hoje é consideravelmente menor perante a regulamentação existente. A substituição do açúcar pelos adoçantes traz uma mudança no curso de certas doenças, como a obesidade e o diabetes (TELLES, 1991).

A WHO formulou a ingestão diária aceitável (IDA) definida para cada adoçante, a qual está relacionada ao peso do indivíduo, garantindo a inocuidade dos produtos que, a princípio, foram desenvolvidos para trazer bem-estar, mas se forem consumidos acima da IDA, podem trazer efeitos colaterais (ROSSONI et al., 2007).

1.2.1 Aspartame

O aspartame (*aspartilfenilanina-1-metiléster*) foi desenvolvido em 1965 pelo pesquisador James Schlatter, vinculado à empresa farmacêutica G. D. Searle (FREITAS e ARAÚJO, 2010). Trata-se de um adoçante sintético pertencente à primeira geração de edulcorantes (WEIHRAUCH e DIEHL, 2004). Este dipeptídeo (Figura 1.5) é obtido a partir da reação entre ácido L-aspártico com éster metílico de L-fenilalanina (RANGAN e BARCELOUX, 2009).

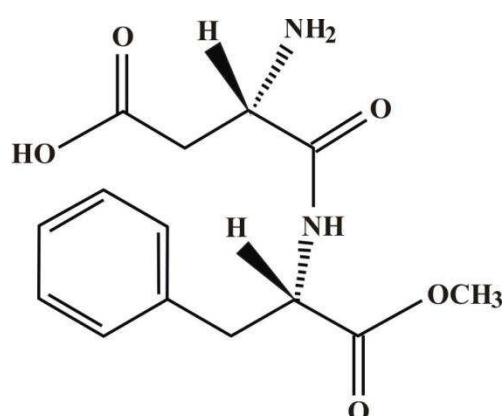


Figura 1.5. Estrutura química do aspartame.
Fonte: ALSUHAIBANI (2010).

Juntamente com a sacarina e o ciclamato, o aspartame apresenta um potencial de doçura cerca de 180 a 200 vezes maior em relação à sacarose

(YILMAZ e UÇAR, 2014), sendo encontrado em mais de 6000 produtos como, refrigerantes, sobremesas, adoçantes de mesa, cereais, dentre outros (MARINOVICH et al., 2013).

Por ser uma substância sintética, é constante a preocupação, por parte dos órgãos competentes, com seus impactos à saúde populacional. Organizações como United State Food and Drug Administration (USFDA) estabeleceram o valor da IDA do aspartame em 50mg/kg de peso corporal/dia. A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO) e The Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) estabeleceram outro valor limite para a IDA, sendo de 40mg/kg por peso corporal/dia (YILMAR e UÇAR, 2014). Essas medidas se baseiam em estudos que avaliam sua segurança, tendo em vista ser um adoçante muito consumido e muito acessível à população.

A preocupação inicial sobre os efeitos do aspartame se deu devido aos produtos da sua hidrólise (Figura 1.6), que são os aminoácidos fenilalanina e ácido aspártico, além do composto metanol (HORIO et al., 2014).

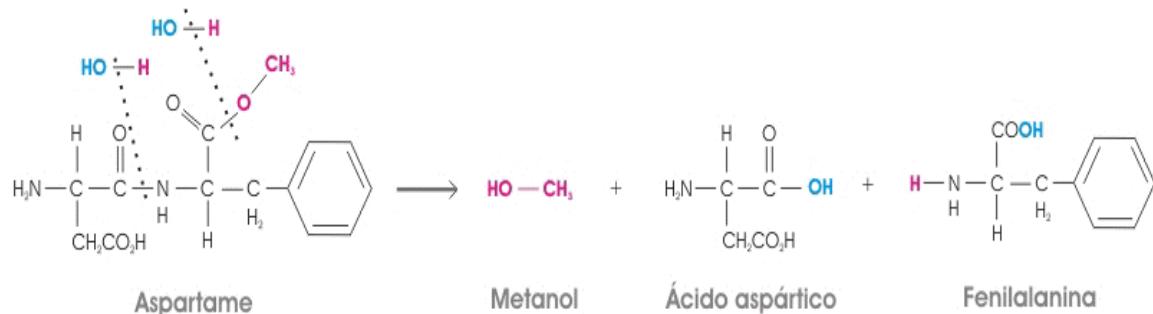


Figura 1.6. Hidrólise do Aspartame.

Fonte: <http://profkaiya.blogspot.com.br/>. Acesso: 09/05/2016.

Estes produtos são absorvidos e metabolizados, não se acumulando no organismo. Eles são encontrados em outros alimentos, como o leite, portanto, mesmo que o aspartame seja consumido, respeitando sua IDA, estes aminoácidos poderão ser adquiridos por outras fontes alimentares (BUTCHKO et al., 2002). Muitas vezes, o resultado total em uma dieta pode ser de 60 vezes mais ácido aspártico e 35 vezes mais fenilalanina, considerando que estes aminoácidos podem ser obtidos a partir do metabolismo do aspartame e de outras fontes alimentares (MARINOVICH et al., 2013).

Durante a avaliação da segurança do aspartame por parte do Comitê Científico dos Alimentos (SCF) e pela European Food Safety Authority EFSA (EFSA) (EFSA, 2013), houve uma atenção em relação à formação do metanol. De acordo com alguns autores, este álcool é responsável pelo efeito carcinogênico e genotóxico do aspartame (SOFFRITTI et al., 2010; HALLDORSSON, 2010). Após experimentações, o SCF e a EFSA consideraram o metanol inofensivo, não possuindo efeito carcinogênico e genotóxico, para aqueles que consomem aspartame em doses abaixo da IDA. O metanol, obtido a partir da hidrólise do aspartame, é idêntico ao metanol encontrado em muitos alimentos, como suco de tomate, por exemplo. Trata-se de um produto com decomposição natural que, ao ser oxidado no fígado, origina outro composto, o formaldeído, o qual vem sendo alvo de preocupação, devido a sua capacidade de promover ligação cruzada no DNA, induzindo danos a danos (KIRKLAND e GATEHOUSE, 2015).

A fenilalanina poderia gerar preocupação nesta avaliação de segurança, no entanto, a EFSA considerou que a IDA não requer preocupação para indivíduos normais e pacientes heterozigotos para a fenilcetonúria, ou seja, indivíduos com moderada redução do metabolismo de fenilalanina (PKU) (EFSA, 2013).

Segundo a Fundação Européia Ramazzini em Oncologia e Ciências do Ambiente (FER), o aspartame introduzido em doses normais aumentou casos de neoplasias em ratos, sendo considerado carcinogênico (SOFFRITTI et al., 2006). Outro estudo mostra que o aspartame induz câncer de fígado e pulmões (SOFFRITTI et al., 2010), porém, em ambos os casos a EFSA desconsiderou uma relação existente entre os tumores e o tratamento com aspartame, mantendo a IDA (EFSA, 2011a,b).

A avaliação da segurança alimentar do aspartame requer, em primeiro plano, identificar o risco potencial desta substância em diferentes condições experimentais *in vitro* e *in vivo*. A EFSA estabeleceu a avaliação da segurança dos aditivos alimentares revisando dados provenientes de estudos realizados durante os anos de 2005, 2006, 2009 e 2011, onde encontrou relatos do aspartame com efeitos indutores de: (i) toxicidade, (ii) diferentes tipos de tumores e (iii) parto prematuro (EFSA, 2012).

Davoli et al. (1986) mencionaram que pequenas amostras de aspartame geram um aumento significativo de metanol no plasma. Skrzydlewski (2003), confirmou que o metanol é responsável por redução do conteúdo celular de glutationa e da atividade de enzimas relacionadas a esta molécula, como a glutationa redutase (GR). Estas informações são confirmadas com o trabalho de Abhilash et al. (2011), no qual foi verificado redução dos níveis de glutationa reduzida (GSH) no fígado e no cérebro de ratos devido ao aspartame (ABHILASH et al. 2013).

Horio et al. (2014) sugerem que o aspartame tem ação indutora à via intrínseca da apoptose, em experimentos *in vitro* com células da linhagem de adrenais de ratos (PC12), com aumento da expressão de Caspases 8 e 9 e citocromo c, gerado pelo estresse oxidativo.

1.2.2 Sucralose

A sucralose (4,1',6'-triclorogalactosacarose) é caracterizada por ser um edulcorante sintético não-nutritivo muito difundido na população (Figura 1.7). Sua síntese ocorreu em 1970, na Universidade de Londres, por Hough e colaboradores, tendo seu desenvolvimento comercial sido realizado por Tate & Lyle, LLC and McNeil Specialty Products Co (MOLINARY e QUINLAN, 2006).

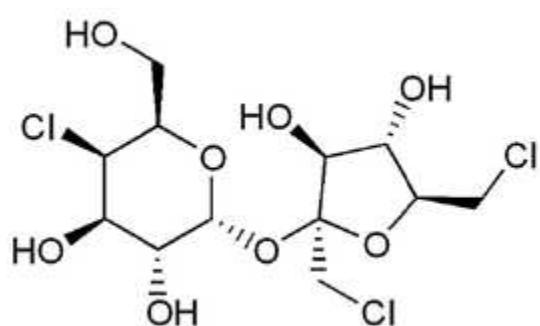


Figura 1.7. Estrutura química da sucralose
Fonte: TOLLEFSEN et al. (2012).

O Canadá, em 05 de setembro de 1991, aprovou a utilização da sucralose como um ingrediente alimentar. A US FDA pronunciou-se em Abril de 1998, permitindo seu uso em 15 categorias de alimentos e bebidas (US FDA,

1999). Em 1999, o FDA permitiu a comercialização como adoçante. Posteriormente, a sucralose foi utilizada em 80 países como edulcorante intenso (BRUSICK et al., 2010) sendo que, atualmente, seu consumo é considerado global (SCHIFFMAN e ROTHER, 2013).

A sucralose é encontrada em mais de 4000 produtos como, bebidas, alimentos lácteos, produtos de panificações e farmacêuticos (MOLINARY e QUINLAN, 2006). Seu potencial de doçura, é 600 vezes maior em relação ao açúcar de mesa (BRUSICK et al., 2010), e apresenta propriedades físico-químicas como, estabilidade à acidez, à temperaturas elevadas e à hidrólise enzimática (MOLINARY e QUINLAN, 2006).

A sucralose é um pó branco cristalino, inodoro, solúvel em água e possui temperatura de fusão elevada (TOLLEFSEN et al., 2012). A sucralose é feita a partir de substituição seletiva de grupos hidroxilos da sacarose por três átomos de cloro (STODDARD e HUGGETT, 2014). A ingestão diária aceitável foi determinada pela FAO, JECFA e EFSA como sendo de 15mg/kg (ISA, 2009 apud TOLLEFSEN et al., 2012).

Experimentos realizados com animais e humanos mostraram que a sucralose não é metabolizada, de forma relevante, por enzimas P450 do fígado (GRICE e GOLDSMITH, 2000) e não é metabolizada, também, gastrointestinalmente (BRUSICK et al., 2008). Aproximadamente 92% da sucralose ingerida é eliminada na forma inalterada, 78,3% pelas fezes e 14,4% pela urina. Parte da sucralose ingerida, cerca de 2,6%, é eliminada pela urina de maneira conjugada (ROBERTS et al., 2000). O meio ácido é apropriado para hidrólise deste composto, havendo a liberação de 4-cloro-4-desoxi-D-galactose (4-CG), que é excretado inalterado pela urina e 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-D-frutose (1,6-DCF) (Figura 1.8) (SHARMA et al., 2014), sendo que este último segue duas vias metabólicas: (i) redução em 1,6 dicloromanitol, com rápida excreção inalterada, pela urina e (ii) conjugação com glutationa (GRICE e GOLDSMITH, 2000).

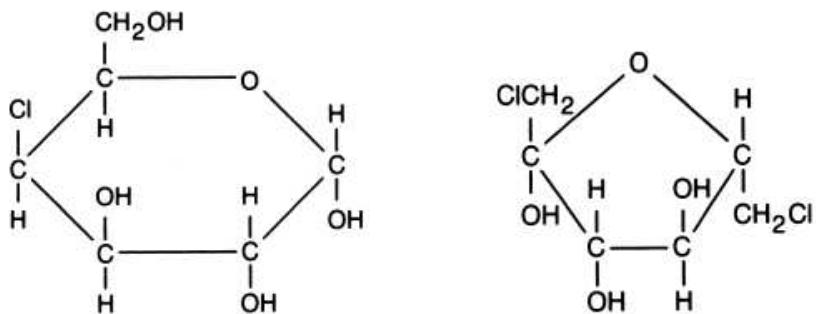


Figura 1.8. Estrutura química do 4-cloro galactose (à esquerda) e 1,6-dicloro frutose (à direita).

Fonte: GRICE e GOLDSMITH (2000).

Diante da grande popularidade e do seu elevado consumo, estão sendo desenvolvidos muitos testes que avaliam a segurança alimentar da sucralose, inclusive, rastreando a sua genotoxicidade.

Cromatogramas de camada fina apontam, em extratos fecais metanólicos de ratos (SIMS et al., 2000) e seres humanos (ROBERTS et al., 2000) que a sucralose é metabolizada no trato gastrointestinal. Segundo Abou-Donia et al. (2008) a baixa absorção do referido adoçante se deve pela sua recirculação ativa no lúmen intestinal, ocasionada pelo transportador de efluxo P-glicoproteína (P-gp) e/ou metabolização por enzimas intestinais do citocromo P3A (CYP3A), que liberam produtos químicos mais polares e solúveis em água.

Brusick et al. (2010) avaliaram a genotoxicidade da sucralose, *in vitro* e *in vivo*, utilizando diferentes ensaios. *In vitro* realizaram-se o Teste Ames de Mutação Reversa em *Salmonella typhimurium* e o Teste de Danos no DNA de *Escherichia coli*. *In vivo* desenvolveram-se o teste que avalia danos cromossômicos em medula óssea de ratos, além de ensaios de micronúcleo, também em ratos. Em todos os ensaios não foi encontrada ação mutagênica e nem clastrogênica exercida pela sucralose.

Stoddard e Huggett (2014) realizaram ensaios de toxicidade para avaliar a eclosão, a sobrevivência e o crescimento de peixes (*Pimephales promelas*) tratados com sucralose e os resultados sugerem ausência de efeito tóxico dessa substância em organismos aquáticos, tendo em vista que nenhum dos aspectos avaliados foi afetado na concentração máxima utilizada (98mg/L).

Outros ensaios foram realizados com outros organismos experimentais. Demir et al. (2014) avaliaram a genotoxicidade da sucralose *in vivo* e *in vitro*

utilizando *D. melanogaster*. *In vivo* desenvolveu-se o Teste de Avaliação da Mutação e Recombinação Somáticas (SMART) e em *in vitro*, realizou-se o teste cometa, analisando hemócitos de larvas de terceiro estágio (72 horas) de *D. melanogaster*. Nos dois procedimentos foram utilizadas as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 75mM e os resultados, nos dois ensaios, sugeriram que a sucralose é um agente não genotóxico.

1.2.3 Sacarina Sódica

A sacarina sódica (Figura 1.9) trata-se de um adoçante sintético, produzido por Remsen e Fahlberg em 1879, sendo muito utilizado a partir de então, principalmente durante a Primeira Guerra Mundial (WHYSNER e WILLIAMS, 1996).

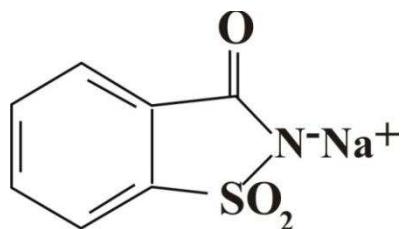


Figura 1.9. Estrutura química da sacarina sódica.
Fonte: WHYSNER e WILLIAMS (1996).

Foram produzidos vários tipos de sacarina, dentre eles a sacarina ácida (H₂Sac), sacarina de cálcio (CaSac), sacarina de potássio (K₂Sac) e sacarina sódica (NaSac) (WHYSNER e WILLIAMS, 1996).

Vários países adquiriram a permissão para o uso da sacarina em alimentos, assim como outros edulcorantes não-calóricos. A Prevention of Food Adulteration (PFA) da Índia, controlou de 1954 até 2000, a utilização e a venda de aditivos em produtos alimentares, sendo que, apenas a sacarina apresentava permissão por este órgão para ser utilizada (BAEDER et al., 1977). Com base em estudos de toxicidade a longo prazo, a ingestão diária recomendável para o consumo da sacarina sódica é de 5mg/kg de peso corporal por dia (FAO/WHO, 1967 apud BANDYOPADHYAY et al., 2008).

Desde que foi desenvolvida, a sacarina sódica vem sendo alvo de diversas pesquisas de investigação sobre seus possíveis danos à saúde, com uma história com bastante controvérsia, o que motivou o Programa Internacional de Segurança Química a determinar a necessidade de constantes testes que avaliam a genotoxicidade *in vivo* e *in vitro*, com o propósito de medir os parâmetros genéticos e interpretar os resultados correlacionando-os ao homem (BANDYOPADHYAY et al., 2008).

Na década de 1970 houve o desenvolvimento do teste de carcinogenicidade utilizando ratos de duas gerações como organismo-teste. Na ocasião, foi utilizada uma dieta com doses elevadas de sacarina sódica por longos períodos, resultando no desenvolvimento de tumores na bexiga dos animais.

Bandyopadhyay et al. (2008) desenvolveram ensaios *in vitro*, com o Teste Ames em bactérias *Salmonella typhimurium* das cepas TA97 e TA100, utilizando as concentrações de 10, 100, 250, 1000 e 10.000 µg/placa. Os resultados apontaram para ausência de sinais mutagênicos.

Fowler et al. (2012) realizaram teste de micronúcleo em diferentes linhagens de roedores. Na sub-linhagem de fibroblastos derivados de pulmão de roedores (CHL), a concentração máxima de sacarina sódica utilizada, 10 milimolar (mM), não induziu formação de micronúcleo, além de não mostrar toxicidade; esta linhagem não apresentou níveis consideráveis de p53. A linhagem TK6, constituída por células linfoblastoides humanas, apresentou resultados semelhantes àqueles encontrados na linhagem CHL; porém, apresentava níveis consideráveis de p53.

Resultados obtidos a partir de testes *in vitro* sempre foram alvo de discussões e controvérsias, como aqueles obtidos pelos estudos de Ishidate Jr. et al. (1988), no qual foi utilizada a linhagem CHL na avaliação da sacarina sódica. Neste estudo houve a ocorrência de aberrações geradas pela sacarina sódica na concentração de 39 mM. Neste caso, deve-se considerar a osmolaridade ideal para cada tipo de célula, pois substâncias adicionadas ao meio alteram a osmolaridade e, consequentemente, o grau de ionização da substância. Sendo assim, a ocorrência de aberrações nem sempre está ligada diretamente à substância testada, mas sim à osmolaridade elevada.

Bandyopadhyay et al. (2008) desenvolveram um ensaio cometa com células da medula de camundongos machos, com as concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg e observaram indução de danos ao DNA, porém o efeito mutagênico foi considerado fraco.

Demir et al. (2014) realizaram testes *in vivo* com *D. melanogaster* por meio do SMART e do ensaio cometa, avaliando a genotoxicidade da sacarina sódica nas seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50 e 75mM. Em ambos os testes, os resultados mostraram ausência de genotoxicidade em linhagens do organismo teste com níveis basais de CYP450. Tripathy et al (1994) realizaram o SMART, utilizando concentrações de sacarina sódica mais elevadas (50, 100 e 300mM), porém a linhagem do organismo teste apresentou níveis mais elevados de CYP450 e os resultados, também, indicaram ausência de genotoxicidade.

Para Whysner e Williams (1996) existem muitas provas de que a sacarina sódica não possui reatividade com o DNA e sim, com mecanismo epigenético envolvido em danos e proliferação celular, com consequente formação de tumor.

É importante ressaltar a atuação da sacarina sódica em processos que contribuem para o controle do câncer, como expresso no trabalho de D'Ascenzio et al. 2014. Mahon et al. (2015) relatam a atuação do adoçante na inibição da metaloenzima anidrase carboxilase IX (CA IX), gerando redução no crescimento e na proliferação de tumores, além de melhorar os efeitos da quimioterapia e radioterapia.

1.2.4 Glicosídeo de esteviol

O glicosídeo de esteviol (SG) é um adoçante natural extraído de um arbusto perene, da família Asteraceae, denominado *Stevia rebaudiana Bertoni* (Figura 1.10), sendo uma planta nativa do Paraguai e das regiões subtropicais do Brasil (BARBET-MASSIN et al., 2015).



Figura 1.10. *Stevia rebaudiana Bertoni*.

Fonte: <http://science-all.com/stevia.html> . Acesso: 10/05/2016.

Das suas folhas é extraído SG que há vários anos vem sendo utilizado em vasta gama de produtos alimentares por ser caracterizado como um adoçante não-calórico (TAVARINI e ANGELINI, 2013). Na América do Sul, a *Stevia* vem sendo utilizada há centenas de anos e, atualmente, além de uma série de alimentos, esta planta é também utilizada em medicamentos (URBAN et al., 2015). Se comparada à América do Sul, a utilização desta planta nos Estados Unidos e Europa é considerada contemporânea no mercado (CARAKOSTAS et al., 2012).

Mesmo sendo uma substância não-calórica este adoçante possui sacarose, apresentando um potencial de doçura entre 200 a 400 vezes superior em relação à sacarose (BARBET-MASSIN et al., 2015). Trata-se de uma alternativa muito requisitada em substituição ao açúcar, mais calórico; por ser natural e possuir um elevado potencial de doçura e devido à necessidade do seu consumo, principalmente, por pessoas que apresentam diabetes tipo 2 e por pessoas obesas. O seu consumo tende a melhorar a qualidade de vida destas pessoas, uma vez que esses distúrbios apresentam índices elevados, sendo considerados como problemas de saúde pública em todo o mundo (ZIMMET et al., 1997).

O SG é quimicamente definido como uma mistura com, no mínimo, 95% de esteviosídeo e rebaudiosídeo A (BELDA-GALBIS et al., 2014). O esteviosídeo é composto por três moléculas de glicose mais esteviol aglicona e o

rebaudiosídeo A possui uma molécula de glicose adicional (Figura 1.11) (CHATSUDTHIPONG e MUANPRAST, 2009). A farmacocinética dos dois componentes do SG é bastante semelhante, apresentando perfil metabólico equivalente (ROBERTS e RENWICH, 2008).

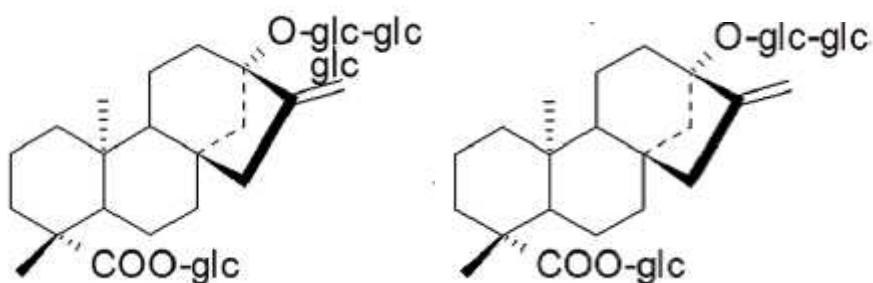


Figura 1.11. Estruturas químicas do Esteviosídeo (à direita) e Rebaudiosídeo A (à esquerda).

Fonte: BARBET-MASSIN et al. (2015).

Mesmo sendo um adoçante considerado natural, existem vários estudos que avaliam a sua segurança alimentar. A FDA, por diversas vezes, negou a entrada da *Stevia* no mercado como aditivo alimentar, porém em 1995 este órgão autorizou a utilização do SG como suplemento dietético (FDA, 1995).

No ano de 2010 a EFSA também aprovou a utilização do SG como aditivo alimentar e considerou a substância como não cancerígena, não genotóxica ou associada a qualquer toxicidade reprodutiva ou de desenvolvimento (EFSA, 2010).

A IDA para o GS foi estabelecida como sendo de 4mg/kg por peso corporal, diariamente (JECFA, 2008 e 2009).

O esteviosídeo é um pó branco cristalino e inodoro e, por suas atividades farmacológicas e terapêuticas, tem sido considerado benéfico à saúde. Apresenta propriedades antitumoral, anti-inflamatória, anti-hiperglicêmico, diurético dentre outras (RIZZO et al., 2013). A absorção do glicosídeo de esteviol é bastante reduzida e ao ser hidrolisado pela microflora do cólon ocorre a liberação de esteviol (Figura 1.12) (KOYAMA et al., 2003).

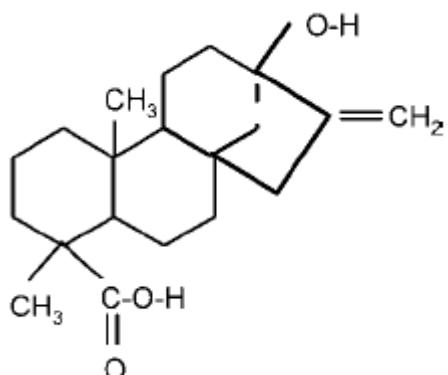


Figura 1.12. Estrutura química do Esteviol.

Fonte: PANPATIL e POLASA (2008).

Existem alguns relatos de ocorrência de genotoxicidade envolvendo o esteviol e seus derivados oxidativos.

Matsui et al. (1996) desenvolveram pesquisas, *in vitro*, avaliando o esteviosídeo e o esteviol. Através do ensaio Ames foi verificado ausência de potencial mutagênico do esteviosídeo e do esteviol, seja com ativação metabólica ou sem ativação metabólica. No teste de mutação FORWARD, o esteviosídeo não induziu aumento significativo de mutações, com ou sem ativação metabólica e o esteviol induziu aumento significativo de mutações, com ativação metabólica. No ensaio UMU, o esteviosídeo não aumentou significativamente a atividade da β -galactosidase, tanto com ativação metabólica como sem ativação metabólica e o esteviol apresentou resultado positivo sem ativação metabólica, com doses baixas e negativo, com ativação metabólica. Testes de aberração cromossômica, com células de hamster chinês, mostraram que o esteviosídeo não gerou aberrações, ao contrário do esteviol, que causou aberrações quando ativado metabolicamente. Ensaios de mutação genética com células CHL foram realizados, apresentando genotoxicidade para o esteviol com ativação metabólica. Ensaio *in vivo*, como o teste de micronúcleo em eritrócitos de medula óssea de camundongo, estes indicou que o esteviol não é indutor de micronúcleos (MATSUI et al. 1996).

Os compostos esteviosídeo e rebaudiosídeo A apresentam características farmacocinéticas muito semelhantes, fato que motivaram Williams e Burdock (2009) a avaliarem o rebaudiosídeo A, utilizando a mesma metodologia empregada em trabalhos de Matsui et al. (1996), que avaliaram apenas o esteviosídeo. Os resultados encontrados com o rebaudiosídeo A e com o

esteviosídeo foram semelhantes no teste Ames, constatando a ocorrência de aberração cromossômica em células de mamíferos e micronúcleo em ratos. Os referidos autores alertam, entretanto, que os resultados positivos para genotoxicidade podem ser interpretados de maneira equivocada, apresentando na realidade um ação citotóxica e não genotóxica, como ocorreu nos resultados do teste de aberração cromossômica realizados com o esteviosídeo por Matsui et al. (1996).

O composto esteviol obtido da hidrólise, tanto do esteviosídeo como do rebaudiosídeo A, é caracterizado como sendo um agente com baixo índice genotóxico, apresentando comportamento citotóxico (WILLIAMS e BURDOCK, 2009). Amney (2011) verificou que elevadas doses de esteviosídeo são responsáveis por reduzirem, significativamente, os níveis de atividade das enzimas superóxido-dismutase (SOD) e catalase (CAT). Altos níveis de substâncias reativas ao ácido tiobarbitúrico (TBARS) foram detectados no grupo submetido à doses elevadas de esteviosídeo, sugerindo indução à peroxidação lipídica como um pró-oxidante e consequente formação de lesão nas membranas celulares. A pesquisa mostra, ainda, que o esteviol contribui para a redução dos níveis da enzima glutationa redutase (GR), comprometendo os níveis de glutationa reduzida (GRH); que consiste no principal antioxidante não enzimático presente na membrana plasmática e solúvel em água.

Rizzo et al (2013) que utilizaram células de neuroblastoma humano em ensaios *in vitro* mostraram que o glicosídeo de esteviol não influenciou significativamente a atividade da Caspase 3, o que sugere que este composto não induz apoptose celular. Este trabalho avaliou a atividade antioxidante e verificou que este composto não reduziu os níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS).

Recentemente foram realizados ensaios *in vitro*, com extrato etanólico de *Stevia rebaudiana* contendo glicosídeo de esteviol, em diferentes linhagens celulares: (i) derivadas de células obtidas de um câncer cervical (HeLa), (ii) do carcinoma colorretal humano (HCT116) e (iii) do carcinoma pancreático humano (MiaPaCa-2). López et al. (2016) verificaram atividade antiproliferativa e antioxidante, com eliminação de radicais livres.

De acordo com painéis de especialistas dos Estados Unidos, as preparações altamente purificadas de glicosídeo de esteviol (igual ou superior a

95%) atendem o padrão exigido pela USFDA, passando a ser classificado como “Geralmente Reconhecido como Seguro” (GRAS) (USFDA, 2014).

Estes padrões que conferem segurança no consumo de determinados alimentos, somente podem ser confirmados com pesquisas que avaliam esta segurança alimentar por metodologias diversificadas empregando diferentes organismos experimentais tais como a *Drosophila melanogaster*, por exemplo.

1.3 *Drosophila melanogaster*

Conhecida como mosca da fruta, a *Drosophila melanogaster* é considerada, pelos geneticistas, como um excelente organismo modelo. Sua utilização em análises científicas vem sendo realizada desde 1909, quando Thomas Hunt Morgan investigou e comprovou a Teoria Cromossômica da Herança (KOHLER, 1994). Trata-se de um inseto da ordem Díptera, com 2 milímetros (mm) de comprimento (Figura 1.13), completando seu ciclo reprodutivo em, aproximadamente, dez dias a uma temperatura ambiente em torno de 25°C (SNUSTAD e SIMMONS, 2001).

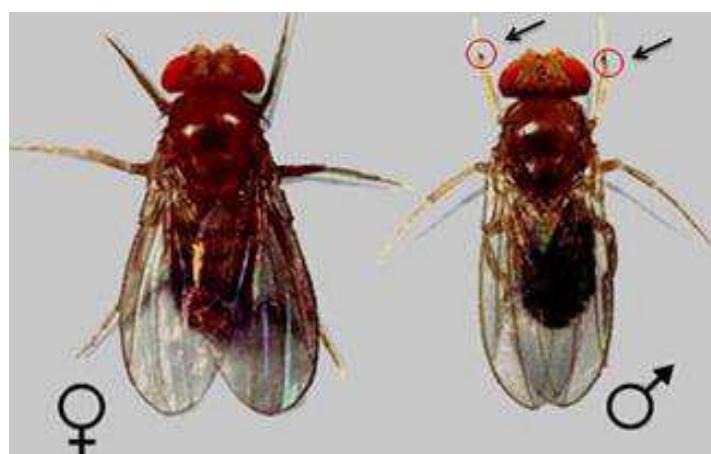


Figura 1.13. Casal de *Drosophila melanogaster*.

Fonte: <https://prezi.com/vhq1i8xz0dck/apresentacao-de-genetica/>. Acesso: 27/01/2015.

O desenvolvimento do padrão corpóreo (Figura 1.14) ocorre em pouco mais de uma semana, no qual é verificada a presença de 3 estágios larvais

(instars), com posterior diferenciação em pupa e, por fim, formação do indivíduo adulto (GRIFFITHS et al., 2008).

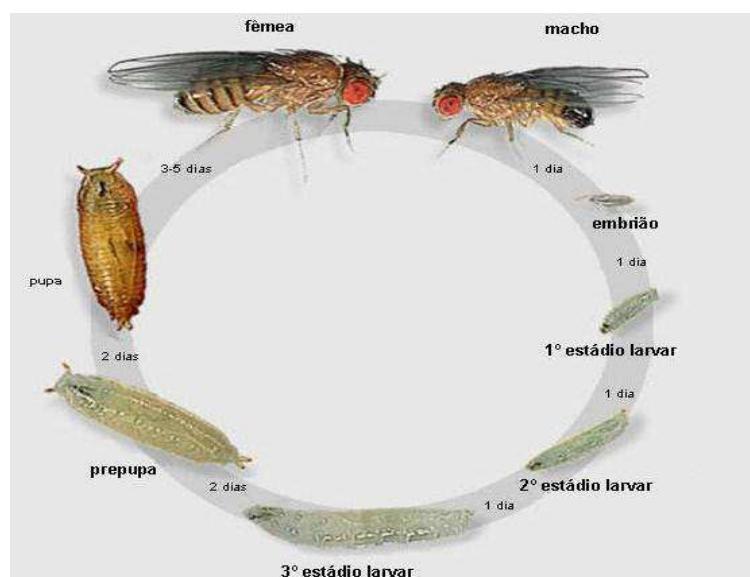


Figura 1.14. Ciclo reprodutivo da *Drosophila melanogaster*.

Fonte: <<http://www.sc.didaxis.pt/hereditariedade/drosophila.htm>>. Acesso: 15/06/2016.

Durante a embriogênese é originado o cérebro com dois hemisférios e o gânglio esofageal, além de 10 pares de discos imaginais e disco genital (Figura 1.15). Estes discos imaginais possuem uma camada de células epidérmicas, responsáveis pela origem de tecidos, órgãos e estruturas anatômicas, como os apêndices específicos de cada segmento (JEIBMANN e PAULUS, 2009).

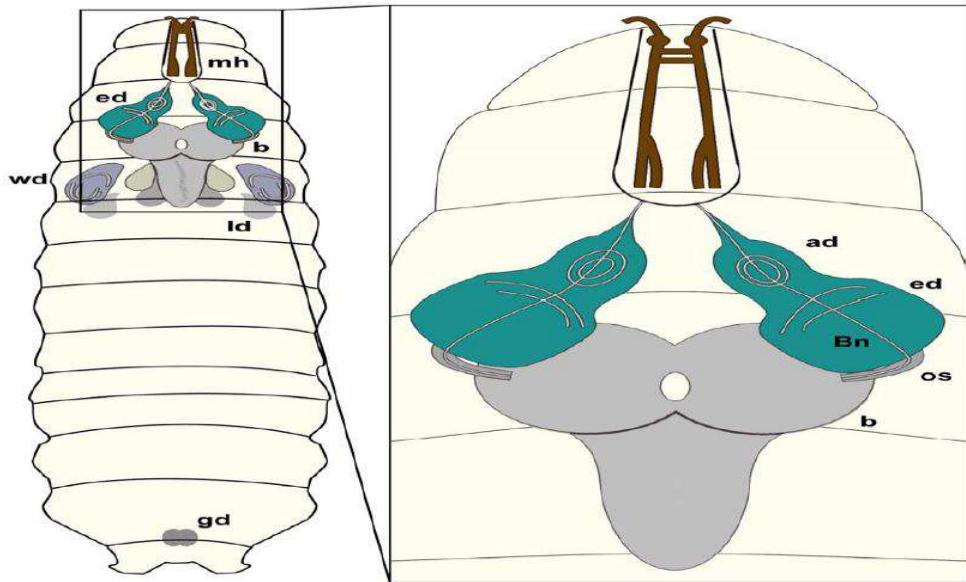


Figura 1.15. Larva de *Drosophila melanogaster* com discos imaginais. Boca (mh), discos imaginais dos olhos (ed); discos imaginais das asas (wd); discos imaginais das pernas (id); discos imaginais das antenas (ad); cérebro (b); gônadas (gd); nervo (Bn) e talo ótico (os).

Fonte: JEIBMANN e PAULUS (2009).

Segundo Nepomuceno (2015), a mais de cinquenta anos, os insetos, em especial a *D. melanogaster*, vem sendo utilizados em pesquisas científicas que visam monitorar danos causados ao DNA por agentes químicos. Jeibmann e Paulus (2009) consideram a *D. melanogaster* como um organismo experimental que oferece inúmeras vantagens na investigação de mecanismos moleculares e celulares adjacentes a doenças humana. Dentre estas vantagens ressalta-se: (i) possui curto ciclo reprodutivo, em torno de 10 a 12 dias; (ii) a cada cruzamento ocorre a formação de grande número de descendentes; (iii) utilização em várias técnicas genéticas; (iv) ampla variedade de indivíduos mutantes. Os fenótipos mutantes podem ser detectados por meio de microscópio estereoscópico, através da análise de recursos externos encontrados no exoesqueleto, como cerdas, vasos nas asas e olhos compostos (JOHNSTON, 2002).

Mesmo havendo divergências anatômicas entre o homem e a mosca da fruta, já se sabe que muitas vias moleculares, envolvendo processos de desenvolvimento destes dois indivíduos, são altamente conservadas (RUBIN e LEWIS, 2000). Mesmo com semelhanças moleculares, algumas diferenças são observadas, como as taxas de mutações em microssatélites, que são superiores

no homem e a diversidade de sequências nucleotídicas, superior na *Drosophila* (AQUADRO et al., 2001).

O ser humano possui cerca de 30.000 genes (MIKLOS e RUBIN, 1996), enquanto que a *D. melanogaster* apresenta 15.000 genes. Dos 287 genes de doenças humanas conhecidas, 197 são homólogos na mosca da fruta, porém, estes genes quando expressos não produzem sintomas na mosca (FORTINI et al., 2000; FEANY e BENDER, 2000). No genoma desta mosca sejam encontrados 3 pares de cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais (JOHNSTON, 2002) e é relatada a conservação evolutiva de genes entre os mamíferos e este organismo, dentre eles os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor (EEKEN et al., 2002).

O gene supressor de tumor *wts* é encontrado nas moscas (JUSTICE et al., 1995). Este gene (*wts*), letal em homozigose, localiza-se no cromossomo 3, balanceado pelo cromossomo *TM3,Sb¹*; tal cromossomo (*TM3,Sb¹*) apresenta múltiplas inversões caracterizadas pela mutação dominante *stubble* (*Sb*), sendo esta fenotipicamente identificada pela presença de pelos curtos (NEPOMUCENO, 2015). As mutações ocorridas no gene *wts* geram verrugas (*warts*) nos discos imaginais das larvas podendo ser visualizadas no indivíduo adulto (Figura 1.16), passando a ser conhecidas como tumores (XU et al., 1995). O gene supressor de tumor *Lats1*, encontrado em mamíferos, é considerado homólogo ao gene *wts*.

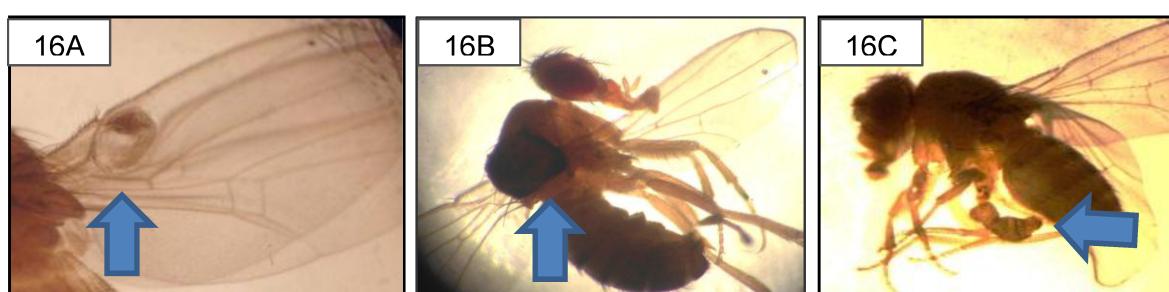


Figura 1.16. Expressão de tumor epitelial em *Drosophila melanogaster*. Na asa (16A), no corpo (16B) e na perna (16C).

A expressão do gene *wts* codifica a enzima quinase serina/treonina, homóloga à proteína quinase distrofia miotónica (DM-PK) presente no ser humano (MAHADEVAN et al., 1993). A família das quinases DM-PK está envolvida na progressão do ciclo celular, principalmente da mitose. Desta maneira, o gene *wts*

controla a morfogênese e a proliferação celular. Segundo Xu et al. (1995), mutantes homozigotos para o gene *wts* apresentam defeitos no desenvolvimento embrionário, podendo chegar à letalidade.

Em seres humanos, o gene *lats1*, homólogo do gene *wts*, atua na regulação negativa do ciclo celular. Durante a mitose, a proteína Lats1 associa-se ao componente de adesão focal no aparelho mitótico (zyxin). Por microinjeção da proteína Lats1 (136 a 700 aminoácidos) ocorre interferência na localização de zyxin no aparelho mitótico, alongando a mitose (HIROTA et al., 2000). A supressão de tumores gerada pelo gene *lats1* ocorre por meio da inibição do crescimento celular, bloqueando a mitose na última fase da interfase (G_2/M) e induzindo a apoptose.

Estudos relatam a existência do gene *wats1* em seres humanos, como sendo idêntico ao gene *lats1* (XIA et al., 2002), localizado na posição 6q24-25 (NISHIYAMA et al., 1999) e codificante da quinase serina/treonina.

Considerando as semelhanças, a *D. melanogaster* tem sido utilizada como objeto de estudo para avaliação de compostos com possível efeito carcinogênico (ORSOLIN et al., 2012; FREITAS et al., 2014; CARDOSO e NEPOMUCENO, 2015).

Para realização do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) são utilizadas duas linhagens mutantes de *D. melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs*, (*mwh*, 3-03), respectivamente (NEPOMUCENO, 2015).

Com a realização do cruzamento entre as duas linhagens *wts/TM3,Sb¹* com *mwh/mwh* obtém-se descendentes heterozigóticos (*wts/+*). A perda da heterozigose ocasiona a formação de clones de células epiteliais nos discos imaginários das larvas, que se manifestam nos adultos sob a forma de verrugas ou tumores (SIDOROV et al., 2001). A perda da heterozigose em larvas de *D. melanogaster* pode ocorrer de maneira espontânea ou induzida por agentes químicos, como é o caso do Cloridrato de Doxorrubicina que, além de apresentar propriedades quimioterápicas, atua como um potente agente recombinogênico (ORSOLIN et al., 2016).

1.4 DOXORRUBICINA

A quimioterapia moderna vem fazendo uso de uma gama de agentes citostáticos (KAISEROVA et al., 2006). Dentre estes agentes, as antraciclinas, que tiveram sua utilização iniciada na década de 1970 em terapias contra tumores de mama, sarcoma e linfoma, dentre outros (EWER e EWER, 2015). O cloridrato de doxorrubicina (DXR) ($C_{27}H_{29}O_{11}HCl$), representado na Figura 1.17, é um antibiótico de antraciclina isolado de bactérias *Streptomyces peucetius var. caesius* com potencial antineoplásico e peso molecular de 580,0 (BITTENCOURT e BRUNSTEIN, 2004).

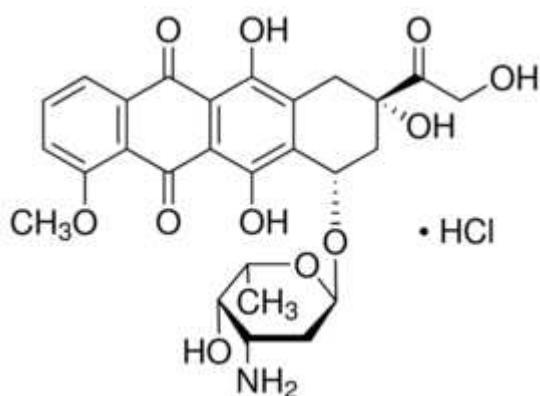


Figura 1.17. Fórmula estrutural da Doxorrubicina.

Fonte:

<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/doxorubicinhydrochloride>. Acesso: 03/06/2016.

O DXR apresenta efeitos antiproliferativos que são realizados por diferentes mecanismos, destacando-se a interação com complexo DNA-topoisomerase II (GERWIRTZ, 1999), impedindo a re-ligaçāo das fitas de DNA seccionadas anteriormente por esta mesma enzima e gerando uma lesão permanente no DNA (MINOTTI et al., 2004).

Embora tenha propriedades antiproliferativas, a DXR é responsável por desencadear uma toxicidade crônica nos tecidos e órgãos, dentre eles o miocárdio, fato relacionado a doses cumulativas (SINGAL e ILISKIVIC, 1998; AZAMBUJA et al., 2005). Esta toxicidade está vinculada à geração de radicais livres de semiquinona (CHU e SARTORELLI, 2005) e ROS (ZHOU et al., 2001)

que afetam a membrana, além de promover intercalação ao DNA e alquilação nesta mesma molécula (KAISEROVA et al., 2006) (Figura 1.18). A DXR é tóxica em situações de hipóxia, condição na qual ROS não podem ser formados (TANNOCK e GUTTMAN, 1981).

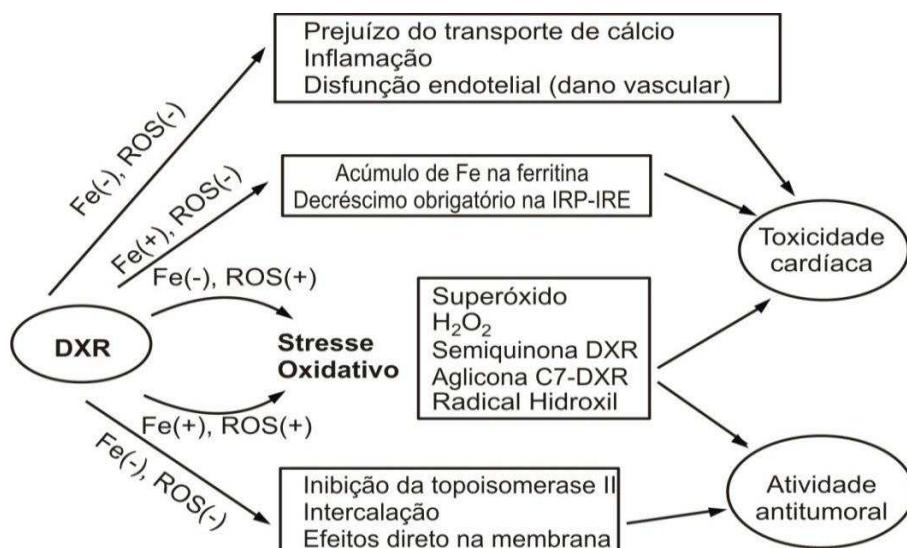


Figura 1.18. Esquema simplificado da interação da Doxorrubicina (DXR) com tumores em células cardíacas.

Fonte: Adaptação de KAISEROVA et al. (2006).

A cardiotoxicidade é uma das lesões mais importantes geradas pela DXR (SIKIC, 2005), sendo que está associada a diversos eventos citotóxicos desencadeadas por este fármaco, dentre eles: danos aos DNA mitocondrial, ruptura da proteína sarcomérica titina, além da desregulação de fatores de transcrição cardíacos (LIM et al. 2004; WOUTERS et al., 2005).

A DXR, embora realize uma função muito relevante no mecanismo de progressão de tumores, exerce um citotoxicidade que pode estar relacionada ao aparecimento de novas lesões, neste caso em tecidos saudáveis.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABHILASH, M.; SAUGANTH PAUL, M.V.; VARGHESE, M.V.; NAIR, R.H. Effect of long term intake of aspartame on antioxidant defense status in liver. **Food and Chemical Toxicology**, v.49, p.1203-1207, 2011.
- ABHILASH, M.; SAUGANTH PAUL, M. V.; VARGHESE, M.V.; NAIR, R. H. Long-term consumption of aspartame and brain antioxidant defense status. **Drug and Chemical Toxicology**, v.36, p.135–140, 2013.
- ABOU-DONIA, M. B.; EL-MARSY, E. M.; ABDEL-RAHMAN, A. A.; McLENDON, R. E.; SCHIFFMAN, S. S. Splenda alters gut microflora and increases intestinal Glycoprotein and cytochrome P-450 in male rats. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.71, p.1415–1429, 2008.
- ALSUHAIBANI, E.S. In Vivo Cytogenetic Studies on Aspartame. **Comparative and Functional Genomics**, v.2010, p.1-4, 2010.
- AMENDOLA, L. C. B; VIEIRA, R. A. Contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 51, n. 4, p.325-330, 2005.
- AMNEY, H. A. Oxidative stress biomarkers in young male rats fed with stevioside. **African Journal of Biochemistry Research**, v.5, p. 333-340, 2011.
- AQUADRO, C. F.; BAUER DuMONT, V.; REED, F. A. Genome-wide variation in the human and fruitfly: A comparison. **Current Opinion in Genetics & Development**, v.11, p.627-634, 2001.
- AZAMBUJA, E.; FLECK, J. F.; BATISTA, R. G.; BARRETO, S. S. M. Bleomycin lung toxicity: who are the patients with increased risk? **Pulmonary Pharmacology & Therapeutics**, v.18, p.363–366, 2005.
- BAEDEKER, C.; HORSTMANN, G.; WEIGAND, W. Oral mutagenicity study (micronucleus test) of Ascesulfam in NMRI mice. **Report**, no. 77.0591, Hoechst AG, Bericht, 1977.
- BANDYOPADHYAY, A.; GHOSHAL, S.; MUKHERJEE, A. Genotoxicity Testing of Low-Calorie Sweeteners: Aspartame, Acesulfame-K, and Saccharin. **Drug and Chemical Toxicology**, v.31, p.447–457, 2008.
- BARBET-MASSIN, C.; GIULIANO, S.; ALLETTO, L.; DAYDÉ, J.; BERGER, M. Nitrogen Limitation Alters Biomass Production but Enhances Steviol Glycoside Concentration in *Stevia rebaudiana Bertoni*. **Plos One**, p.1-16, 2015.
- BASEN-ENGQUIST, K.; CHANG, M. Obesity and cancer risk: recent review and evidence. **Current oncology reports**, v.13, p.71–76, 2011.

BELDA-GALBIS, C. M.; PINA-PÉREZ, M. C.; ESPINOSA, J.; MARCO-CELDRÁN, A.; MARTÍNEZ, A.; RODRIGO, D. Use of the modified Gompertz equation to assess the Stevia rebaudiana Bertoni antilisterial kinetics. **Food Microbiology**, v.38, p.56-61, 2014.

BITTENCOURT, H. N. S.; BRUNSTEIN, C. C. **Fármacos antineoplásicos**. In: FUCHS, F. S.; WANNMACHER, L.; FERREIRA, M. B. Farmacologia clínica: fundamentos da terapêutica racional. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. Cap.42. p.512-531.

BRASIL. Presidência da República. Subchefia de assuntos jurídicos. **Lei 8918 de 14 de Julho de 1994**. Dispõe sobre a padronização, a classificação, o registro, a inspeção e fiscalização da produção e do comércio de bebidas. Disponível em: <http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/leis/L8918.htm>. Acesso em: 07/06/2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Resolução nº04 de 24 de novembro de 1988. Aprova a revisão das tabelas I, II, III, IV e V referentes a aditivos intencionais, bem como os anexos I, II, III, IV e VIII, todos do decreto nº55871 de 26 de março de 1965. **Lex**, São Paulo, v.52, p. 1591-1621, out./dez., 1988.

BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo: Patologia Geral**. 5.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2013. 463p.

BRUSICK, D. J.; FIELDS, W.R.; MYHR, B.C.; DOOLITTLE, D. J. **Chemical Toxicology**. In: HAYES, A. W. (Ed.). Principles and Methods of Toxicology. 5ed. CRC Press Taylor & Francis, Boca Raton, FL, p. 1179–1221, 2008.

BRUSICK, D. J.; GROTZ, V. L; SLESINSKI, R.; KRUGER, C. L.; HAYES, A. W. The absence of genotoxicity of sucralose. **Food and Chemical Toxicology**, v.48, p.3067–3072, 2010.

BUTCHKO, H. H.; STARGEL, W. W.; COMER, C. P.; MAYHEW, D. A.; BENNINGER, C.; BLACKBURN, G. L.; de SONNEVILLE, L. M.; GEHA, R. S.; HERTELENDY, Z.; KOESTNER, A.; LEON, A. S.; LIEPA, G. U.; McMARTIN, K. E.; MENDENHALL, C. L.; MUNRO, I. C.; NOVONTNY, E. J.; RENWICK, A.G.; SCHIFFMAN, S. S.; SCHOMER, D. L.; SHAYWITZ, B. A.; SPIERS, P. A.; TEPHLY, T. R.; THOMAS, J. A.; TREFZ, F.K. Intake of aspartame versus the Acceptable Daily Intake. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.35, p.13-16, 2002.

CALLE, E. E.; KASSKS, R. Overweight, obesity and cancer: epidemiological evidence and proposed mechanisms. **Nature Reviews Cancer**, v.4, p.579–591, 2004.

CARAKOSTAS, M. C.; PRAKASH, I.; KINGHORN, A. D.; WU, C. D.; SOEJARTO, D. D. Steviol glycosides. In: O'BRIEN NABORS, L. (Ed.). Alternative Sweeteners. CRC Press, Florida, p. 159–180, 2012.

CARDOSO, A. C. M.; NEPOMUCENO, J. C. Evaluation of the modulating effect of garlic oil (*Allium sativum* L.) on the carcinogenicity of doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v.12, p.160-175, 2015.

CHATSUDHTHIPONG, V.; MUANPRASAT, C. Stevioside and related compounds: therapeutic benefits beyond sweetness. **Pharmacology and Therapeutics**, v.121, p. 41–54, 2009.

CHU, E.; SARTORELLI, A. C. **Quimioterapia do câncer**. In: KATZUNG, B. G. Farmacologia básica e clínica. 9ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap.55. p. 751-777.

CHUNG, Y. S.; LEE, M. Genotoxicity Assessment of Erythritol by Using Short-term Assay. **Toxicological research**, v. 29, p. 249-255, 2013.

D'ASCENZIO, M.; CARRADORI, S.; DE MONTE, C.; SECCI, D.; CERUSO,M.; SUPURAN, C. T. Design, synthesis and evaluation of N-substituted saccharin derivatives as selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrase XII. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, p.1821–1831, 2014.

DAVOLI, E.; CAPPELLINI, L.; AIROLDI, L.; FANELLI, R. Serum methanol concentrations in rats and in men after a single dose of aspartame. **Food and Chemical Toxicology**, v.24, p.187-189, 1986.

DEMIR, E.; TURNA,F.; AKSAKAL, S.; KAYA,B.;MARCOS, R. Genotoxicity of Different Sweeteners in *Drosophila*. **Fresenius Environmental Bulletin**, v.23, p.3426-3432, 2014.

EEKEN, J. C. J.; KLINK, I.; VEEN, B. L. V.; FERRO, W. Induction of epithelial tumors in *Drosophila melanogaster* heterozygous for the tumor suppressor gene wts. **Environmental and Molecular Mutagenesis**, v.40, p.277-282, 2002.

EFSA. Panel on Food Additives and Nutrient Sources (ANS). Scientific Opinion on safety of steviol glycosides for the proposed uses as a food additive. **EFSA Journal**, v. 8, p. 1537, 2010.

EFSA. Statement on two recent scientific articles on the safety of artificial sweeteners. **EFSA Journal**, v.9, p.1996, 2011a.

EFSA. EFSA Statement on the scientific evaluation of two studies related to the safety of artificial sweeteners. **EFSA Journal**, v.9, p.2089, 2011b.

EFSA. Guidance for submission for food additive evaluations. **EFSA Journal**, v.10, p.60, 2012. Disponível em: <<http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/ar12.htm>>. Acesso: 11/01/2015.

EFSA. **DRAFT Scientific Opinion on the re-evaluation of aspartame (E 951) as a food additive**. 2013. Disponível em:< <http://www.efsa.europa.eu/en/corporate/pub/ar13.htm> >. Acesso: 10/02/2015.

EL-BACHA, T. SOLA-PENNA, M. **Alterações no metabolismo de células neoplásicas**. In: DA POIAN, A.T.; CARVALHO-ALVES, P.C. (Eds). Hormônios e Metabolismo: Integração e correlações clínicas. Rio de Janeiro: Atheneu, p.319-322, 2003.

EWER, M. S.; EWER, S. M. Cardiotoxicity of anticancer treatments. **Nature Reviews | Cardiology**, v.12, p. 547-558, 2015.

FDA. **Center for Food Safety and Applied Nutrition (CFSAN) /Office of Food Additive Safety**. Attachment revised, 1995.

FEANY, M. B.; BENDER, W. W. A *Drosophila* model of Parkinson's disease. **Nature**, v.404, p.394–398, 2000.

FERGUSON, L. R. Dietary influences on mutagenesis – where is this field going? **Environmental and molecular mutagenesis**, v.51, p.909–918, 2010.

FORTINI, M. E.; SKUPSKI, M. P.; BOGUSKI, M. S.; HARIHARAN, I. K. A survey of human disease gene counterparts in the *Drosophila* genome. **The Journal of cell**, v.150, p.23–30, 2000.

FOWLER, P.; SMITH, K.; YOUNG, J.; JEFFREY, L.; KIRKLAND, D.; PFUHLER, S.; CARMICHAEL, P. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. **Mutation Research**, v. 742, p.11– 25, 2012.

FREITAS, A. S.; ARAÚJO, A. B. Edulcorante artificial: Aspartame - uma revisão de literatura. **Revista Eletrônica Multidisciplinar Pindorama do Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia da Bahia – IFBA**, n.1, 2010. Disponível em:< <http://www.revistapindorama.ifba.edu.br>>. Acesso: 02/06/2016.

FREITAS, C. R.; MACHADO, N. M.; NEPOMUCENO, J. C. Evaluation of anticancer effect of rutin on a test for the detection of clones of epithelial tumors (warts) in *Drosophila melanogaster*. **Perquirere**, v.11, p.247-257, 2014.

GEWIRTZ, D. A. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the anthacycline antibiotics andriamycin and daunorubicin. **Biochemical pharmacology**, v.57, p.727-741, 1999.

GRICE, H. C.; GOLDSMITH, L.A. Sucralose – an overview of the toxicity data. **Food and Chemical Toxicology**, v.38, p.1–6, 2000.

GRIFFITHS, A. F; WESSLER, S. R; LEWONTIN, R. C; CARROL, S. B. **Introdução à genética**. 9.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. 666p.

HALLDORSSON, T. Intake of artificially sweetened soft drinks and risk of preterm delivery. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.92, p.1540–1542, 2010.

HIROTA, T.; MORIXAKI, T.; NISHIYAMA, Y.; MARUMOTO, T.; TADA, K.; HARA, T.; MASUKO, N.; INAGAKI, M.; HATAKEYAMA, K.; SAYA, H. Zyxin, a Regulator of Actin Filament Assembly, Targets the Mitotic Apparatus by Interacting with H-Warts/Lats1 Tumor Suppressor. **The Journal of Cell Biology**, v.149, p.1073–1086, 2000.

HIRSCH, H. A.; ILIOPOULOS, D.; JOSHI, A.; ZHANG, Y.; JAEGER, S. A.; BULYK, M.; TSICHLIS, P. N.; LIU, X. S.; STRUHL, K. A transcriptional signature and common gene networks link cancer with lipid metabolism and diverse human diseases. **Cancer Cell**, v.17, p.348–361, 2010.

HORIO, Y.; SUN, Y.; LIU, C.; SAITO, T.; KURASAKI, M. -induced apoptosis in PC12 cells. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v.37, p.158-165, 2014.

IBGE. **Pesquisa de orçamentos familiares 2008-2009**: avaliação nutricional da disponibilidade de alimentos no Brasil. Rio de Janeiro, 2010.

INCA. **Estimativa 2016**: Incidência de Câncer no Brasil 2016. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016>>. Acesso: 05/02/2016.

ISHIDATE JR., M.; HARNOIS, M.C.; SOFUNI, T. A comparative analysis of data on the clastogenicity of 951 chemical substances tested in mammalian cell cultures. **Mutation Research/Reviews in Genetic Toxicology**, v.195, p.151–213, 1988.

JECFA. **Compendium of Food Additive Specifications**. Monograph 5. Steviol glycosides, 2008. Disponível em: <<http://www.fao.org/docrep/011/i0345e/i0345e00.htm>>. Acesso: 20/01/2015.

JECFA. Safety evaluation of certain food additives. Prepared by the 69th meeting of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. **WHO Food Additives Series**, v. 66, p.183–220, 2009.

JEIBMANN, A.; PAULUS, W. *Drosophila melanogaster* as a Model Organism of Brain Diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v.10, p.407-440, 2009.

JOHNSTON, D. S. The art and design of genetic screens: *Drosophila melanogaster*. **Nature**, v. 3, 176-188, 2002.

JORDE, L. B; CAREY, J. C; BAMSHAD, M. J. **Genética Médica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. 350 p.

JUSTICE, R. W; ZILIAN, O.; WOODS, D. F; NOLL, M.; BRYANT, P. J. The *Drosophila* tumor suppressor gene *warts* encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. **Genes & Development**, v. 9, p.534-546, 1995.

KAISEROVÁ, H.; DEN HARTOG, G. J. M.; SIMUNEK, T.; SCHRÖTEROVÁ, L.; KVASNICKOVÁ, E.; BAST, A. Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. **British Journal of Pharmacology**, v.149, n.7, p.920-930, 2006.

KIRKLAND, D.; GATEHOUSE, D. Aspartame: A review of genotoxicity data". **Food and Chemical Toxicology**, v. 84, p.161-168, 2015.

KOHLER, R. E. **Lords of the Fly: Drosophila Genetics and the Experimental Life**, v. 15. University Chicago Press, Chicago: Illinois, 1994.

KOYAMA, E.; SAKAI, N.; OHORI, Y.; KITAZAWA, K.; IZAWA, O.; KAKEGAWA, K.; FUJINO, A.; UI, M. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. **Food and Chemical Toxicology**, v.41, p.875-883, 2003.

LIM, C. C; ZUPPINGER, C.; GUO, X.; KUSTER, G. M.; HELMES, M.; EPPENBERGER, H. M.; SUTER, T. M.; LIAO, R.; SAWYER, D. B. Anthracyclines induce calpain-dependent titin proteolysis and necrosis in cardiomyocytes. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, p.8290–8299, 2004.

LOK, K. Y. W.; CHUNG, W. Y.; IRIS, F. Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. **Food Additives & Contaminants, Part B, Surveillance**, v.3, p.148–155, 2010.

LÓPEZ, V.; PÉREZ, S.; VINUESA, A.; ZORZETTO, C.; ABIAN, O. Stevia rebaudiana ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside. **Food & function**, v.7, p. 2107–2113, 2016.

MAALOUF, M.; RHO, J. M.; MATTSON, M. P. The neuroprotective properties of calorie restriction, the ketogenic diet, and ketone bodies. **Brain research reviews**, v.59, p.293–315, 2009.

MAHADEVAN, M. S.; AMEMIYA, C.; JANSEN, G.; SABOURIN, L.; BAIRD, S.; NEVILLE, C. E.; WORMSKAMP, N.; SEGERS, B.; BATZER, M.; LAMERDIN, J. Structure and genomic sequence of the myotonic dystrophy (DM kinase) gene. **Human Molecular Genetics**, v. 2, p.299-304, 1993.

MAHON, B. P.; HENDON, A. M.; DRISCOLL, J. M.; RANKIN, G. M.; POULSEN, S.; SUPURAN, C. T.; MCKENNA, R. Saccharin: A lead compound for structure-based drug design of carbonic anhydrase IX inhibitors. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.23, p.849–854, 2015.

MATSUI, M.; MATSUI, K.; KAWASAKI, Y.; ODA, Y.; NOGUCHI, T.; KITAGAWA, Y.; SAWADA, M.; HAYASHI, M.; NOHMI, T.; YOSHIHIRA, K.; ISHIDATE JR., M.;

SOFUNI, T. Evaluation of the genotoxicity of stevioside and steviol using six *in vitro* and one *in vivo* mutagenicity assays. **Mutagenesis**, v.11, p.573-579, 1996.

MARINOVICH, M.; GALL, C. L.; BOSETTI, C.; GALLUS, G.; VECCHIA, C. L. Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: Regulatory safety and epidemiological issues. **Food and Chemical Toxicology**, v.60, p.109–115, 2013.

MIKLOS, G. L. G.; RUBIN, G. M. The Role of the Genome Project in Determining Gene Function: Insights from Model Organisms. **Cell**, v. 86, p.521-529, 1996.

MINOTTI, G.; MENNA, P.; SALVATORELLI, E.; CAIRO, G.; GIANNI, L. Anthracyclines: Molecular advances and pharmacologic developments in antitumor activity and cardiotoxicity. **Pharmacological Reviews**, v.56, p.185-229, 2004.

MOLINARY, S.; QUINLAN, M. E. **Sucralose**. In: MITCHELL, H. (Ed.). Sweeteners and sugar alternatives in food technology. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, p.130–145, 2006.

MONTEIRO, C. A.; MOURARAC, J. C.; CANNON, G.; NG, S. W.; POPKIN, B. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. **Obesity Reviews**, v.14, p.21-28, 2013.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6.ed. Porto Alegre: Artmed, 2014.1298p.

NEPOMUCENO, J. C. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). **Adv Tech Biol Med.**, v.3, n.3, 2015.

NISHIYAMA, Y.; HIROTA, T.; MORISAKI, T.; HARA, T.; MARUMOTO, T.; IIDA, S.; MAKINO, K.; YAMAMOTO, H.; HIRAOKA, T.; KITAMURA, N.; SAYA, H. A human homolog of *Drosophila* warts tumor suppressor, h-warts, localized to mitotic apparatus and specifically phosphorylated during mitosis. **FEBS Letters**, v. 459, n. 2, p.159-165, 1999.

NOMURA, D. K.; LONG, J. Z.; NIJESSEN, S.; HOOVER, H. S.; NG, S. W.; CRAVATT, B. F. Monoacylglycerol lipase regulates a fatty acid network that promotes cancer pathogenesis. **Cell**, v.140, p.49–61, 2010.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Assessment of the mutagenic, recombinagenic and carcinogenic potential of orlistat in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.50, p. 2598-2604, 2012.

ORSOLIN, P. C.; SILVA-OLIVEIRA, R. G.; NEPOMUCENO, J. C. Modulating effect of simvastatin on the DNA damage induced by doxorubicin in somatic cells of *Drosophila melanogaster*. **Food and Chemical Toxicology**, v.90, p.10-17, 2016.

PANPATIL, V. V.; POLASA, K. Assessment of stevia (*Stevia rebaudiana*)-natural sweetener: A review. **Journal of Food Science and Technology**, v.45, p.467–473, 2008.

PLEASANCE, E.D. A comprehensive catalogue of somatic mutations from a human cancer genome. **NATURE**, v.463, p. 191-196, 2010.

RANGAN, S.; BARCELOUX, D. G. Food Additives and Sensitivities. **Disease-a-Month**, v.55, p.292-311, 2009.

RIZZO, B.; ZAMBONIN, L.; ANGELONI, C.; LEONCINI, E.; SEGA, F. V. D.; PRATA, C.; FIORENTINI, D.; HRELIA, S. Steviol Glycosides Modulate Glucose Transport in Different Cell Types. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2013, p. 1-11, 2013.

ROBERTS, A.; RENWICK, A. G. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 46, p.31–39, 2008.

ROBERTS, A.; RENWICK, A. G.; SIMS, J.; SNODIN, D. J. Sucralose metabolism and pharmacokinetics in man. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38 (Suppl. 2), p.S31–41, 2000.

ROSSONI, E.; GRAEBIN, L. B.; MOURA, R. P. Sweetens Present In The Formula Of Diet And Light Soft Drinks, Juices And Teas. **Revista da Faculdade de Odontologia**, Porto Alegre, v.8, n.1/3, p.5-11, jan./dez.2007.

RUBIN, G. M.; LEWIS, E. B. A brief history of *Drosophila*'s contributions to genome research. **Science**, v.287, p.2216–2218, 2000.

SCHIFFMAN, S. S; ROTHER, K.I. Sucralose, a synthetic organochlorine sweetener: overview of biological issues. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, v.16, p.399–451, 2013.

SHARMA, V. K.; OTURAN, M.; KIM, H. Oxidation of artificial sweetener sucralose by advanced oxidation processes: a review. **Environmental Science and Pollution Research**, v. 21, p.8525–8533, 2014.

SIDOROV, R. A.; UGNIVENKO, E. G.; KHOVANOVA, E. .; BELITSKY, G. A. Induction, of tumor clones in *D. melanogaster* *wts*+/ heterozygotes with chemical carcinogens. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**, v.498, p.181-191, 2001.

SIKIC, B. L. Fármacos antineoplásicos. In: CRAIG, C.R.; STITZEL,R.E. Farmacologia moderna com aplicações clínicas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005. Cap.56. p. 601-618.

SIMS, J.; ROBERTS, A.; DANIEL, J.W.; RENWICK, A. G. The metabolic fate of sucralose in rats. **Food and Chemical Toxicology**, v. 38(suppl. 2), p. S115–S121, 2000.

SINGAL, P. K.; ILISKOVIC, N. Doxorubicin-induced cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, v.339, p.900–905, 1998.

SKRZYDLEWSKA, E. Toxicological and metabolic consequences of methanol poisoning. **Toxicology mechanisms and methods**, v.13, p.277–293, 2003.

SNUSTAD, D. P; SIMMONS, M. J. **Fundamentos de genética**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2001. 756 p.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; DEGLI ESPOSTI, D.; LAMBERTINI, L.; TIBALDI, E.; RIGANO, A. First experimental demonstration of the multipotential carcinogenic effects of aspartame administered in the feed to Sprague-Dawley rats. **Environmental Health Perspectives**, v. 114, p. 379–385, 2006.

SOFFRITTI, M.; BELPOGGI, F.; MANSERVIGI, M.; TIBALDI, E.; LAURIOLA, M.; FALCIONI, L.; BUA, L. Aspartame administered in feed, beginning prenatally through life span, induces cancers of the liver and lung in male Swiss mice. **American Journal of Industrial Medicine**, v.53, p.1197–1206, 2010.

STODDARD, K. I.; HUGGETT, D. B. Early Life Stage (ELS) Toxicity of Sucralose to Fathead Minnows, *Pimephales promelas*. **Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology**, v. 93, p.383–387, 2014.

STRATTON, M. R.; CAMPBELL, P. J.; FUTREAL, P. A. The cancer genome. **Nature**, v.458, p.719–724, 2009.

TANNOCK, I.; GUTTMAN, P. Response of Chinese hamster ovary cells to anticancer drugs under aerobic and hypoxic conditions. **British journal of cancer**, v.43, p. 245–248, 1981.

TANZER, J. M. **Adoçantes e Cárie**: Alguns pontos emergentes. In: BOWEN, W.H.; TABAK, L.A. Cariologia para a Década de 90. São Paulo: Santos, 1995. p. 383-396.

TAVARINI, S.; ANGELINI, L. G. *Stevia rebaudiana* Bertoni as a source of bioactive compounds: the effect of harvest time, experimental site and crop age on steviol glycoside content and antioxidant properties. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, p.2121–2129, 2013.

TELLES, A. **Acessulfame-k como substituto alternativo para sacarose**. Monografia (Especialização em Odontopediatria) – Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 1991.

TOLLEFSEN, K. E.; NIZZETTO, L.; HUGGETT, D. B. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. **Science of the Total Environment**, v.438, p.510–516, 2012.

TRIPATHY, N. K.; MISHRA, R.; ANANDKUMAR, A.; SAHU, G. P. Lack of Genotoxicity of Saccharin and Sodium Saccharin studied in the wing spot and sex-linked recessive lethal tests. **Revista Internacional de Contaminación Ambiental**, v.10, p.89-98, 1994.

URBAN, J. D.; CARAKOSTAS, M. C.; TAYLOR, S. L. Steviol glycoside safety: Are highly purified steviol glycoside sweeteners food allergens? **Food and Chemical Toxicology**, v. 75, p. 71–78, 2015.

US FDA. Food additives permitted for direct addition to food for human consumption: sucralose, 1999. Disponível em:
<http://www.fda.gov/ohrms/dockets/98fr/081299b.txt> - Acesso: 05/02/2015.

US FDA. GRAS Notice Inventory, GRN: 252, 253, 275, 278, 283, 287, 303, 304, 323, 328, 329, 349, 354, 365, 367, 369, 380, 388, 395, 418, 448, 456, 461, 467, 473, 2014. Disponível em:
www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=grasListing – acesso: 10/02/2016.

WANG, Z.; SINGHVI, A.; KONG, P.; SCOTT, K. Taste representations in the Drosophila brain. **Cell**, v.117, p.981–991, 2004.

WARBURG, O. **Über den Stoffwechsel der Carcinomzelle**. Naturwissenschaften, 1924.

WARBURG, O. On the Origin of Cancer Cells. **Science**, v.123, p. 309-31, 1956.

WEIHRAUCH, M. R.; DIEHL, V. Artificial sweeteners- do they bear a carcinogenic risk? **Annals of Oncology**, v. 15, p. 1460-1465, 2004.

WICKI, A.; HAGMANN, J. Diet and cancer. **The European Journal of Medical Sciences**, v.141, p.01-08, 2011.

WILLIAMS, L. D.; BURDOCK, G. A. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. **Food and Chemical Toxicology**, v.47, p.1831–1836, 2009.

WHO. **World Health Statistics**. 2011. Disponível em: <<http://www.who.int/whosis/whostat/2011/en/>> - Acesso: 09/02/2015.

WHO. **The 10 leading causes of death in the world, 2000 and 2012**. 2014. Disponível em: <<http://who.int/mediacentre/factsheets/fs310/en>>. Acesso: 05/02/2016.

WHYSNER, J.; WILLIAMS, G. M. Saccharin Mechanistic Data and Risk Assessment: Urine Composition, Enhanced Cell Proliferation, and Tumor Promotion. **Pharmacology & therapeutics**, v.71, p. 225-252, 1996.

WOUTERS, K. A.; KREMER, L. C. M.; MILLER, T. L.; HERMAN, E. H.; LIPSHULTZ, S. E. Protecting against anthracycline-induced myocardial damage: a review of the most promising strategies. **British Journal of Haematology**, v.131, p.561–578, 2005.

XIA, H.; QI, H.; LI, Y.; PEI, J.; BARTON, J.; BLACKSTAD, M.; XU, T.; TAO, W. LATS1 tumor suppressor regulates G2/M transition and apoptosis. **Oncogene**, v. 21, p.1233 ± 1241, 2002.

XU, T.; WANG, W.; ZHANG, S.; STEWART, R. A.; YU, W. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila lats* gene encodes a putative protein kinase. **Development**, v.121, p.1053–1063, 1995.

YILMAZ, S.; UÇAR, A. A review of the genotoxic and carcinogenic effects of aspartame: does it safe or not?. **Cytotechnology**, v. 66, p. 875-881, 2014.

ZANINI, R. V. **Prevalência de utilização de adoçantes dietéticos: um estudo de base populacional**. 2010. 123f. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) – Departamento de Medicina Social, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas. 2010.

ZHOU, S.Y.; PALMEIRA, C. M.; WALLACE, K. B. Doxorubicin-induced persistent oxidative stress to cardiac myocytes. **Toxicology letters**, v.121, p.151-157, 2001.

ZHOU, S. T.; HUANG, C.; WEI, Y. The metabolic switch and its regulation in cancer cells. **Science China Life Sciences**, v.53, p. 942-958, 2010.

ZIMMET, P. Z.; McCARTY, D. J.; DE COURTEN, M. P. The global epidemiology of non-insulin-dependent diabetes mellitus and the metabolic syndrome. **Journal of Diabetes and its Complications**, v.11, p.60–68, 1997.

CAPÍTULO II

**Avaliação do efeito carcinogênico de edulcorantes por meio do teste para
detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila*
*melanogaster***

RESUMO

Os adoçantes podem ser nutritivos e não nutritivos, naturais ou sintéticos, sendo os últimos mais doces em relação ao açúcar de mesa. Estes compostos naturais possuem uso crescente por serem mais seguros, embora esta segurança não possa ser considerada total. Os adoçantes mais consumidos são os não calóricos, dentre eles o aspartame, a sucralose, a sacarina sódica e o glicosídeo de esteviol. Tais substâncias sempre foram alvo de estudos relacionados à genotoxicidade, porém, a obtenção de resultados inconclusivos incentivam a realização de novos ensaios, que contemplem os princípios da genética toxicológica. O presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de avaliar o potencial carcinogênico de edulcorantes por meio do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster*. Foram utilizadas larvas descendentes do cruzamento de fêmeas virgens *wts/TM3* com machos *mwh/mwh*, que foram cronicamente tratadas com um controle negativo (água osmose reversa), um controle positivo doxorrubicina (DXR) a 0,4mM e cinco concentrações diferentes de aspartame (0,85; 1,7; 3,4; 6,8 e 13,6 mM), sucralose (0,5; 1,25; 2,5; 5,0 e 10mM), sacarina sódica (25; 50; 100; 200 e 400mM) e glicosídeo de esteviol (2,5; 5,0; 10; 20 e 40mM) separadamente. Os resultados mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0.05$) na frequência de tumores observada nos indivíduos tratados com aspartame, sucralose, sacarina sódica e glicosídeo de esteviol quando comparado ao controle negativo. Conclui-se, portanto, que nas presentes condições experimentais e para o organismo modelo *Drosophila melanogaster*, os quatro adoçantes testados não induziram a formação de tumores.

Palavras-chave: Adoçantes. Ausência de carcinogenicidade. Mosca da fruta. *Wts*.

ABSTRACT

The sweeteners may be nutritious and non-nutritious, natural or synthetic, the latter being sweeter compared to table sugar. These natural compounds have increased use to be safer, although this security can not be considered complete. The most consumed sweeteners are noncaloric, including aspartame, sucralose, sodium saccharin and steviol glycoside. Such substances have always been the target of studies related to genotoxicity, but getting inconclusive results encourage new tests that address the principles of genetic toxicology. This study was conducted in order to evaluate the carcinogenic potential of sweeteners by testing for the detection of epithelial tumor clones (warts) in *Drosophila melanogaster*. descendants larvae were used crossing virgin females wts / TM3 with male mwh / mwh, that have been chronically treated with a negative control (reverse osmosis water), one positive control doxorubicin (DXR) at 0.4 mM and five different concentrations of aspartame (0.85; 1.7; 3.4; 6.8 and 13.6 mM), sucralose (0.5; 1,25; 2,5; 5,0 and 10 mM), sodium saccharin (25, 50; 100; 200 and 400mM) and steviol glycoside (2.5, 5.0, 10, 20 and 40mM) separately. The results showed no statistically significant difference ($p > 0.05$) in the frequency of tumors observed in subjects treated with aspartame, sucralose, saccharin and steviol glycoside when compared to the negative control. It follows therefore that in these experimental conditions and the model organism *Drosophila melanogaster*, the sweeteners four tested did not induce tumor formation.

Keywords: Sweeteners. Absence of Carcinogenicity. Fruitfly. Wts.

1. INTRODUÇÃO

Os alimentos industrializados vêm, cada vez mais, ganhando a preferência da população. Pesquisas de aquisição de gêneros alimentícios mostram que, desde a década de 1990, houve uma crescente venda de alimentos processados e ultraprocessados em países de renda média como o Brasil (MONTEIRO et al., 2013). Louzada et al. (2015) relatam que 21,5% do consumo médio diário dos brasileiros, com dez ou mais anos de idade, decorre da ingestão de alimentos ultraprocessados. Fatos como este vêm ao encontro da atividade industrial que produz alimentos acentuada utilização de aditivos (LOK et al., 2010). No mundo todo já foram aprovados mais de 3000 aditivos (YILMAZ e UÇAR, 2014); entre eles os edulcorantes.

Os adoçantes podem ser nutritivos e não nutritivos, naturais ou sintéticos. Os adoçantes naturais possuem uso crescente por serem mais seguros, embora esta segurança não seja total (CHUNG e LEE, 2013). Dentre os adoçantes mais consumidos destacam-se o aspartame, a sucralose, a sacarina sódica e o glicosídeo de esteviol, os quais tiveram seus consumos aprovados no Brasil, de acordo com Lei 8918, de 14 de Julho de 1994 (BRASIL, 1994).

O aspartame (*aspartilfenilalanina-1-metiléster*) é caracterizado como um adoçante sintético. Apresenta potencial de doçura de 180 a 200 vezes maior em relação à sacarose (YILMAZ e UÇAR, 2014). É encontrado em mais de 6000 produtos como, refrigerantes, sobremesas, adoçantes de mesa, cereais, dentre outros (SCHERNHAMMER et al., 2012).

A sucralose (*4,1',6'-triclorogalactosacarose*) também é um edulcorante sintético. A grande demanda desse adoçante pode ser atribuída ao seu potencial de doçura, cerca de 600 vezes maior em relação ao açúcar de mesa. A sucralose é considerada um adoçante muito popular, sendo encontrada em mais de 4000 produtos como, bebidas, alimentos lácteos, produtos de panificações e farmacêuticos (MOLINARY e QUINLAN, 2006).

A sacarina é o adoçante sintético não calórico mais consumido pela população mundial (BARAN e YILMAZ, 2006; LIMA et al., 2010). Apresenta potencial de doçura de 300 vezes maior em relação à sacarose (KROGER et al.,

2006). Comercialmente pode ser usada na forma sódica (NaSac) ou na forma cálcica (LIMA et al., 2010).

O glicosídeo de esteviol é um adoçante natural extraído de um arbusto perene da família Asteraceae denominado *Stevia rebaudiana* Bertoni, planta nativa do Paraguai e das regiões subtropicais do Brasil (CATHARINO e SANTOS, 2012). Mesmo sendo considerado não calórico, este adoçante possui sacarose, apresentando potencial de docura de 250 a 300 vezes maior em relação ao açúcar de mesa (AWNEY, 2011).

Estas substâncias são muito consumidas pela população durante toda a vida, o que motiva o desenvolvimento de estudos que avaliem possíveis efeitos genotóxicos e/ou carcinogênicos a elas associados (CHUNG e LEE, 2013), contemplando os princípios da genética toxicológica. Nesse contexto, vários testes têm sido empregados, dentre eles o teste de detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *Drosophila melanogaster* (NEPOMUCENO, 2015). O gene *wts* encontrado na mosca, é caracterizado como supressor de tumor, homólogo ao *LATS1* nos seres humanos (JUSTICE et al., 1995). As mutações ocorridas no gene *wts* geram tumores semelhantes a verrugas, fenotipicamente visíveis nos apêndices da mosca (XU et al., 1995).

Os adoçantes estão presentes em vários alimentos industrializados, o que facilita consumo contínuo e elevado por longos períodos da vida, além de terem sua aquisição bastante facilitada.

O presente trabalho foi desenvolvido com o propósito de avaliar o potencial carcinogênico dos adoçantes aspartame, sucralose, sacarina sódica e glicosídeo de esteviol, por meio do teste de detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) em *D. melanogaster*.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 AGENTES QUÍMICOS

2.1.1 Aspartame

O adoçante sintético aspartame (AS) apresenta fórmula molecular C₁₄H₁₈N₂O₅ (CAS 22839-47-0). É descrito como um pó branco cristalino com peso molecular de 294,3g/mol; adquirido da distribuidora Chemistry Produtos Naturais & Farmacêuticos, tendo sua origem na China, pertencente ao lote ALL 054885, com 98,79% de pureza.

Foram utilizadas cinco concentrações de aspartame (0,85; 1,7; 3,4; 6,8 e 13,6mM) diluídas em água osmose reversa. A estrutura química deste edulcorante está representada na Figura 2.1.

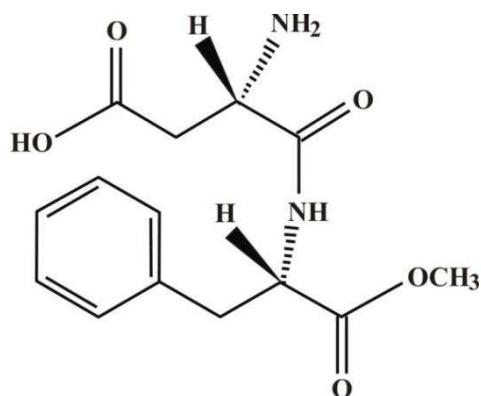


Figura 2.1. Fórmula estrutural do aspartilfenilanina-1-metiléster.
Fonte: ALSUHAIBANI (2010).

2.1.2 Sucratose

O adoçante sintético sucratose apresenta fórmula molecular C₁₂H₁₉Cl₃O₈ (CAS 56038-13-2) e é descrito como pó cristalino quase branco, com peso molecular de 397,6g/mol. Foi adquirido da distribuidora Pharmanostra, sendo original na China/Hong Kong. O produto utilizado pertence ao lote 13010004C, com 99,07% de pureza.

Foram utilizadas cinco concentrações de sucratose (0,5; 1,25; 2,5; 5,0 e 10mM) diluídas em água de osmose reversa. A estrutura química da sucratose está representada na Figura 2.2.

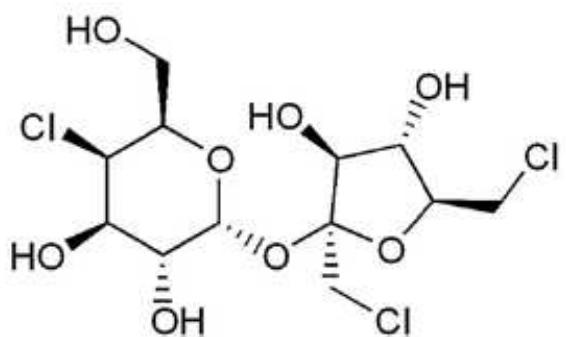


Figura 2.2. Fórmula estrutural do 4,1,60-triclorogalactosacarose.

Fonte: TOLLEFSEN et al. (2012).

2.1.3 Sacarina Sódica

O adoçante sintético Sacarina Sódica apresenta fórmula molecular $C_7H_4O_3$ (CAS 128-44-9) e é descrito como pó cristalino branco, inodoro, com peso molecular de 242,21g/mol. Comercializado pela distribuidora EML Ely Martins, o produto utilizado no experimento pertence ao lote 121216, com 99,61% de pureza.

Foram utilizadas cinco concentrações Sacarina Sódica (25; 50; 100; 200 e 400mM) diluídas em água osmose reversa. A estrutura química do referido adoçante está representada na Figura 2.3.

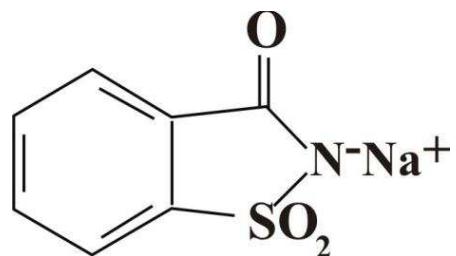


Figura 2.3. Fórmula estrutural da Sacarina Sódica.

Fonte: WHYSNER e WILLIAMS (1996)

2.1.4 Glicosídeo de Esteviol

O adoçante natural glicosídeo de esteviol é composto, predominantemente, por esteviosídeo (no mínimo 95%), com fórmula molecular C₃₈H₆₀O₁₈ (CAS 57817-89-7) e peso molecular de 804,88; além de rebaudiosídeo A, com fórmula molecular C₄₄H₇₀O₂₃ (CAS 58543-16-1) e peso molecular de 967,01g/mol. A estrutura química destes dois compostos está representada na Figura 2.4.

É descrito como um pó branco cristalino e inodoro e está presente no mercado sob vários nomes comerciais como *Finn*®, sendo este produzido por Cosmed Indústria de Cosméticos e Medicamentos S/A. O produto utilizado pertence ao lote H13M0114. Foram utilizadas cinco concentrações de glicosídeo de esteviol (2,5; 5,0; 10; 20 e 40mM) diluídas em água osmose reversa.

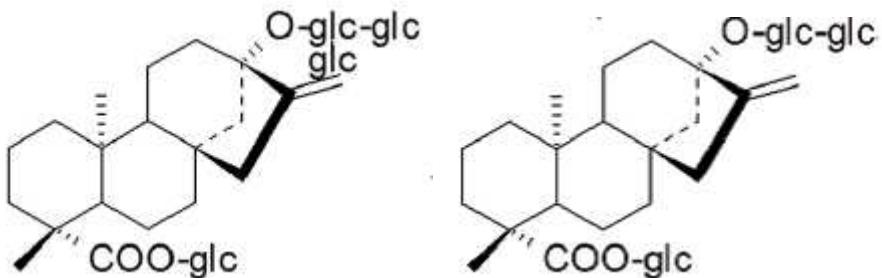


Figura 2.4. Fórmula estrutural do Esteviosídeo (à direita) e Rebaudiosídeo A (à esquerda).

Fonte: BARBET-MASSIN et al. (2015).

2.1.5 Doxorrubicina

O cloridrato de doxorrubicina (DXR), com fórmula molecular C₂₇H₂₉O₁₁HCl (CAS 25316-40-9), é um fármaco presente no mercado com vários nomes comerciais dentre eles, Adriblastina® RD, fabricado e envazado por Activis Italy S.p – Nerviano, Milão/Itália. Registrado, importado e distribuído por Pfizer Laboratório Ltda. É apresentado sob forma de ampolas de 50mg. A DXR apresenta-se sob a forma de um pó liofilizado de coloração avermelhada, conservado em local protegido da luz a temperatura de 15 a 30°C. Foi utilizada nos experimentos como controle positivo.

Em todos os experimentos utilizou-se 25mL de água de osmose reversa como solvente para diluir 0,03538g de DXR, resultando em uma concentração de 0,4mM. A estrutura química deste composto está representada na Figura 2.5.

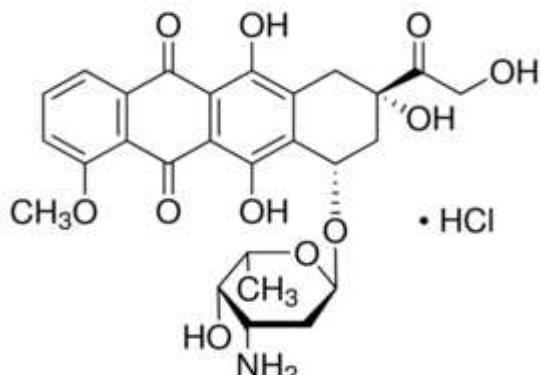


Figura 2.5. Fórmula estrutural do Cloridrato de Doxorrubicina

Fonte:

<<http://www.sigmaaldrich.com/catalog/substance/doxorubicinhydrochloride>>. Acesso: 03/06/2016.

2.2 TESTE PARA DETECÇÃO DE CLONES DE TUMORES EPITELIAIS EM *Drosophila melanogaster*

2.2.1 Linhagens, estoque, cruzamento e tratamento

Na realização do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (warts) utilizaram-se duas linhagens mutantes de *Drosophila melanogaster* (*wts* e *mwh*) portadoras dos marcadores genéticos *warts* (*wts*, 3-100) e *multiple wing hairs*, (*mwh*, 3-03), respectivamente. A linhagem *wts* foi gentilmente disponibilizada por Bloomington *Drosophila* Stock Center, da Universidade de Indiana nos Estados Unidos (USA), registrado sob o número: Bloomington/7052. Já a linhagem *mwh/mwh* foi prontamente cedida pelo Dr. Ulrich Graf (Physiology and Animal Husbandry, Institute of Animal Science, ETH Zurich, Schwerzenbach, Switzerland).

Os estoques das moscas são cultivados no Laboratório de Citogenética e Mutagênese do Centro Universitário de Patos de Minas – UNIPAM, sendo mantidos em frascos de $\frac{1}{4}$ de litro contendo meio de cultura para *D.*

melanogaster. Esse meio é composto por 820 mL de água; 25g de fermento (*Sacchoromyces cerevisiae*); 11 g de ágar; 156 g de banana e 1g de nipagin. As linhagens são conservadas dentro de uma incubadora B.O.D. 411 D, a temperatura de 25°C e 60% de umidade.

Machos *mwh/mwh* foram cruzados com fêmeas virgens *wts/TM3,Sb¹* e postos por um período de 8 horas em frascos contendo meio de cultura para ovoposição. Este meio é constituído por uma base sólida de ágar (3% de ágar em água) e uma camada de fermento biológico fresco suplementado com sacarose.

Foram utilizadas as larvas de 3º estágio (72 ± 4 horas) do primeiro cruzamento (*mwh/mwh* x *wts/TM3,Sb¹*), que foram transferidas para frascos contendo 1,5g de purê de batata instantâneo da marca Yoki (meio alternativo para *D. melanogaster*). Estas larvas foram tratadas, separadamente, com 5mL das cinco concentrações de cada um dos adoçantes em análise: aspartame, sucralose, sacarina sódica e glicosídeo de esteviol, separadamente. Utilizou-se um controle negativo (água osmose reversa) e um controle positivo (Doxorrubicina 0,4 mM).

O experimento foi realizado em duplicata, sendo que em uma das séries de repetições executou-se o teste de toxicidade. Para tanto, foram adicionadas a cada frasco, 100 larvas juntamente com as soluções experimentais, de modo separado. Após o período de empupação, observou-se o percentual de adultos sobreviventes, atestando a toxicidade dos compostos analisados em cada concentração testada.

As larvas ficaram expostas aos agentes químicos testados por um período crônico de 48 horas, até ocorrer a empupação. Após o processo de metamorfose, as moscas foram coletadas e conservadas em frascos devidamente identificados, contendo etanol (C₂H₆O) 70%.

2.2.2 Análise das moscas

Somente as moscas adultas de pelos longos e finos foram analisadas, ou seja, somente aquelas portadoras do gene *wts* com o平衡ador cromossômico (*TM3,Sb¹*) ausente. As moscas adultas que apresentam pelos

curtos e grossos foram descartadas, uma vez que não possuem o gene em estudo (*wts*).

Para análise os indivíduos foram transferidos para uma placa escavada contendo glicerina (Glicerol, C₃H₈O₃) e analisadas sob lupa estereoscópica para visualização e contagem de tumores, com auxílio de um pincel macio para manusear as moscas.

2.2.3 Análise estatística

As diferenças estatísticas entre as frequências de tumores das concentrações testadas e os controles (positivo e negativo), foram calculadas utilizando o teste *U*, não paramétrico, de Mann-Whitney, empregando o nível de significância $\alpha=0,05$.

3. RESULTADOS

O experimento realizado requer um número considerável de moscas para confiabilidade da análise estatística dos resultados. Inicialmente, avaliamos a toxicidade, em *D. melanogaster*, das cinco concentrações dos quatro compostos testados, justificando a realização do tratamento em duplicata. A toxicidade foi avaliada considerando-se os números de larvas que foram expostas ao composto (100 larvas por frasco) por 48 horas, e o número de moscas que atingiram a fase adulta após exposição. Havendo um número elevado de sobreviventes (acima de 75%), entende-se que a concentração não afetou o desenvolvimento larval, podendo então ser utilizada para realização do teste para detecção de clones de tumores epiteliais (*warts*) (DEMIR et al., 2013).

As concentrações de aspartame utilizadas na avaliação da toxicidade foram estabelecidas baseadas no trabalho desenvolvido por Jagadeesh (2011), no qual foi utilizado a *D. melanogaster* como organismo-teste. A Figura 2.6 mostra, em nossa avaliação, elevada taxa de moscas que atingiram a fase adulta; acima de 80% para os controles (água e DXR) e para as cinco concentrações de aspartame. Foram estes dados de sobrevivência que atestaram segurança na

utilização das cinco concentrações (0,85; 1,7; 3,4; 6,8 e 13,6mM) de aspartame no teste de detecção de clones de tumores epiteliais em *D. melanogaster*.

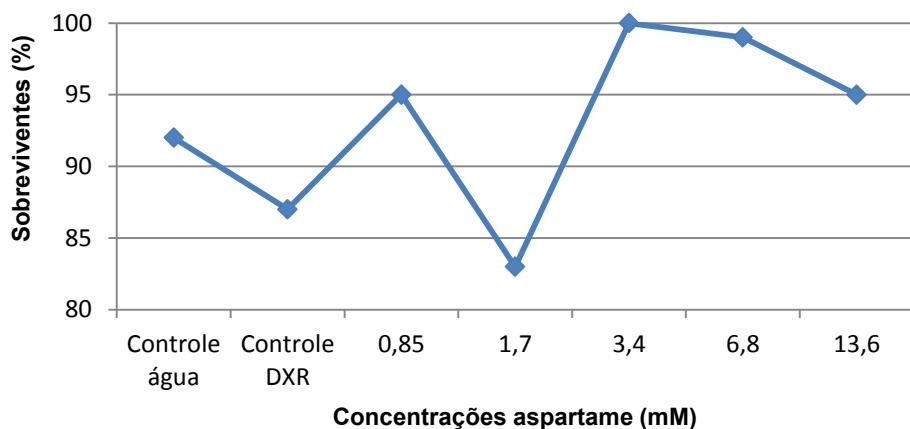


Figura 2.6. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose de larvas de 72h, tratadas isoladamente com DXR (0,4mM) e diferentes concentrações de aspartame.

A Tabela 1 mostra a frequência de tumores encontrados nos diferentes segmentos do corpo da *D. melanogaster* tratadas com cinco concentrações em mM de aspartame isoladamente, e respectivos controles negativo e positivo. Os resultados indicam que não houve diferença significativa ($p>0,05$) entre as frequências de tumores encontradas nas cinco concentrações de aspartame e o controle negativo, sugerindo que o aspartame não apresenta potencial carcinogênico.

As moscas tratadas isoladamente com o agente mutagênico e carcinogênico DXR a 0,4mM (controle positivo) apresentaram resultados estatisticamente significativos ($p<0,05$) quanto à expressão de tumores em *D. melanogaster*, se comparado ao controle negativo, o que valida o teste, assim como seus resultados. Este comportamento da DXR foi verificado também nos tratamentos envolvendo os adoçantes sucralose, sacarina sódica e glicosídeo de esteviol, cujas análises estão descritas adiante neste trabalho.

A sucralose, outro edulcorante testado, teve as concentrações utilizadas na avaliação da toxicidade estabelecidas com base no trabalho desenvolvido por Bootman e Lodge (1981), no qual foi utilizado a *D. melanogaster* como organismo-teste. De acordo com a curva (Figura 2.7), observa-se uma

elevada taxa de sobrevivência, superior a 85% para os controles e para as cinco concentrações do adoçante sucralose. Foram estes dados de sobrevivência que atestaram para a segurança na utilização destas cinco concentrações (0,5; 1,25; 2,5; 5,0 e 10,0mM) de sucralose no teste de detecção de clones de tumores epiteliais em *D. melanogaster*.

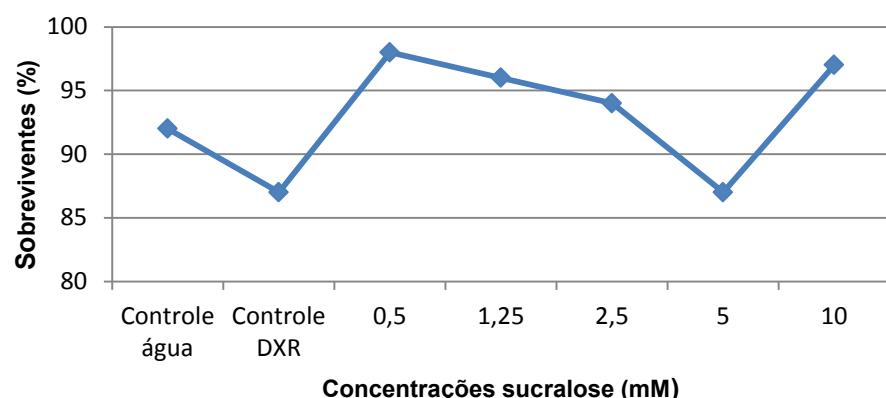


Figura 2.7. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose de larvas de 72 h, tratadas isoladamente com DXR (0,4mM) e diferentes concentrações de sucralose.

A Tabela 2 mostra a frequência de tumores encontrados nos diferentes segmentos do corpo da *D. melanogaster* tratadas com cinco concentrações em mM de sucralose isoladamente, com o controle negativo e o controle positivo. Os resultados mostram que não houve diferença significativa ($p>0.05$) entre as frequências de tumores encontradas nas cinco concentrações de sucralose em relação ao controle negativo, sugerindo que a sucralose não apresenta potencial na indução de tumores.

No que se refere à sacarina sódica, as concentrações avaliadas no teste de toxicidade foram estabelecidas baseadas no trabalho desenvolvido por Tripathy et al. (1994), no qual foi utilizado a *D. melanogaster* como organismo teste. A Figura 2.8, mostra taxa de sobrevivência superior a 75% para os dois controles e para as cinco concentrações testadas do adoçante. Foram estes dados que atestaram para a segurança na utilização destas cinco concentrações (25; 50; 100; 200 e 400mM) de sacarina sódica no teste de detecção de clones de tumores epiteliais em *D. melanogaster*.

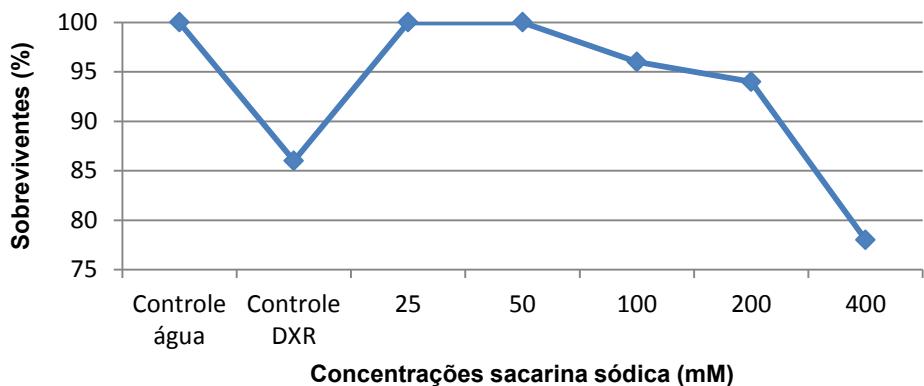


Figura 2.8. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose de larvas de 72h, tratadas isoladamente com DXR (0,4mM) e diferentes concentrações de sacarina sódica.

A Tabela 3 mostra a frequência de tumores encontrados nos diferentes segmentos do corpo da *D. melanogaster* tratadas com cinco concentrações em mM de sacarina sódica isoladamente, com o controle negativo e o controle positivo. Os resultados apontam que não houve diferença significativa ($p>0.05$) entre as frequências de tumores encontradas nas cinco concentrações de sacarina sódica em relação ao controle negativo, sugerindo que a sacarina sódica não apresenta potencial carcinogênico em *D. melanogaster*.

As concentrações do edulcorante glicosídeo de esteviol avaliadas no teste de toxicidade foram estabelecidas baseadas no trabalho desenvolvido por Abdel-Tawab et al. (2012), no qual foi utilizado a *D. melanogaster* como organismo-teste. A Figura 2.9 mostra elevada taxa de sobrevivência, superior a 75% para o controle água e para as cinco concentrações do adoçante. Estes dados atestaram a segurança na utilização destas cinco concentrações (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0mM) do glicosídeo de esteviol no teste de detecção de clones de tumores epiteliais em *D. melanogaster*.

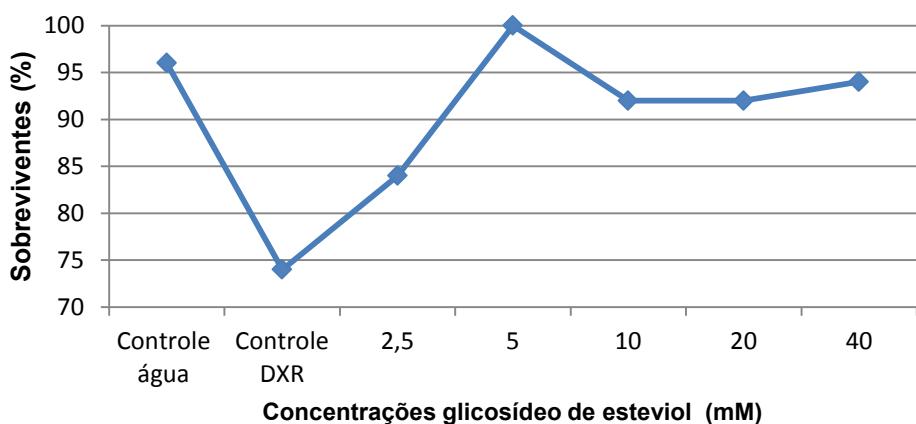


Figura 2.9. Porcentagem de sobrevivência das moscas após a metamorfose de larvas de 72h, tratadas isoladamente com DXR (0,4Mm) e diferentes concentrações de glicosídeo de esteviol.

A Tabela 4 mostra a frequência de tumores encontrados nos diferentes segmentos do corpo da *D. melanogaster* tratadas com cinco concentrações em mM de glicosídeo de esteviol isoladamente, com o controle negativo e o controle positivo. Os resultados mostram que não houve diferença significativa ($p>0.05$) entre as frequências de tumores encontradas nas cinco concentrações de glicosídeo de esteviol em relação ao controle negativo, sugerindo que o glicosídeo de esteviol não apresenta potencial carcinogênico.

4. DISCUSSÃO

Os edulcorantes mencionados foram escolhidos como objeto de estudo deste trabalho devido a observação do seu crescente consumo pela população, uma vez que encontram-se presentes em vários alimentos industrializados e oferecem um conteúdo de baixas calorias. Os edulcorantes sempre foram alvo de ensaios que testassem a sua segurança alimentar, como aqueles que avaliam o seu potencial genotóxico e carcinogênico. Porém, vários resultados se apresentaram de maneira contraditória, o que sugeriu a necessidade de realização de ensaios adicionais para avaliar possível efeito carcinogênico desses edulcorantes.

A DXR, utilizada como controle positivo neste experimento, apresenta diferentes mecanismos de mutagenicidade, como a biotransformação redutiva do anel quinona originando um radical semiquinona que possui efeito tóxico direto ou participa de reações de oxidorredução. É observado, também, a formação de radicais livres de oxigênio, conferindo uma citotoxicidade secundária (GEWIRTZ, 1999). A DXR, portanto, possui diversos efeitos citotóxicos. Porém, sua principal ação associa-se a um efeito sobre a topoisomerase II, uma DNA girase de atividade intensa em células em proliferação (KAISEROVÁ et al., 2006).

Apesar dos resultados deste estudo não apontarem para um efeito carcinogênico do aspartame, muitas pesquisas já realizadas sugerem que esse adoçante possui potencial genotóxico. Trabalhos com estes resultados positivos para a genotoxicidade são relevância, uma vez que a genotoxicidade, em muitos casos, está relacionada com a carcinogenicidade. Rencüzogullari et al. (2004) investigaram o potencial genotóxico do aspartame utilizando o teste de aberrações cromossômica (CA) em culturas de linfócitos humanos, no qual foi verificado que o adoçante induziu aumento significativo de aberrações cromossômicas quando comparado com o grupo controle.

Kamath et al. (2010) investigaram a genotoxicidade do aspartame por meio da formação de micronúcleos em células animais e os resultados mostraram um aumento significativo de micronúcleos policromáticos em eritrócitos de camundongos albinos suíços em todas as concentrações de aspartame testadas (250mg/kg; 455mg/kg; 500mg/kg e 1000mg/kg). Os autores sugeriram que esse adoçante pode ser considerado um agente clastogênico.

Demir et al. (2014) verificaram a genotoxicidade do aspartame *in vivo* por meio do Teste de Avaliação da Mutação e Recombinação Somáticas (SMART), utilizando a *D. melanogaster* como organismo teste. Os autores também constataram genotoxicidade *in vitro* por meio da realização do teste cometa, analisando hemócitos de larvas de terceiro estágio (72 horas). Os resultados nos dois procedimentos sugeriram que o aspartame é um agente genotóxico fraco para as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 75mM.

No que se refere ao efeito sobre indução de câncer diretamente, Marinovich et al. (2013) relataram que o aspartame não possui associação

consistente com neoplasias hematopoiéticas e nem com câncer em cérebro, mama, próstata e órgãos digestórios.

O presente estudo mostra que o adoçante aspartame, embora seja considerado por muitos autores como agente genotóxico, não pode ser considerado um agente carcinogênico. Horio et al. (2014) esclarecem que o possível estresse oxidativo, gerado pela utilização do aspartame, é desencadeado pela debilitação do mecanismo de defesa antioxidant exercido pela glutathione redutase, o que leva a célula a estimular a via intrínseca da apoptose. O aspartame efetua ação indutora à via intrínseca da apoptose em experimentos *in vitro* com células PC12, fato verificado pelo aumento da expressão de Caspases 8 e 9 e citocromo c gerada pelo estresse oxidativo. Diante dessa perspectiva, sugere-se, para estudos futuros, uma investigação da expressão das Caspase 8 e 9 e citocromo c, com técnicas *in vivo* em diferentes organismos experimentais.

Deve-se considerar, também, que existem vários genes envolvidos com a gênese e progressão do câncer e o fato de os resultados da presente pesquisa apontarem para ausência de efeito carcinogênico do aspartame em relação ao gene *wts* (supressor de tumor), isso não significa que esse efeito possa ser generalizado para os demais genes envolvidos no processo.

A sucralose vem sendo objeto de investigação há muitos anos e vários estudos comprovam a sua segurança alimentar diante de resultados que apontam para ausência de genotoxicidade. Entretanto, as vias metabólicas devem ser consideradas nestes estudos, afim se evitar resultados contraditórios como aqueles encontrados nos trabalhos de Sasaki et al. (2002), para o qual, alguns autores consideram os resultados como sendo falso positivos.

A sucralose é obtida a partir da substituição de três átomos de cloro por três grupos hidroxila na molécula de sacarose, o que confere uma notável estabilidade na ligação glicosídica, no que diz respeito a ácido/base e hidrólise enzimática. Este fato, juntamente com estudos de farmacocinética, comprovam a baixa absorção deste adoçante no ser humano, cerca de 15% ocorrendo no trato superior gastrointestinal e sua grande eliminação através das fezes de forma inalterada (GRICE e GOLDSMITH, 2000). O meio ácido é apropriado para hidrólise deste composto, havendo a liberação de 4-cloro-4-desoxi-D-galactose (4-CG), que é excretado inalterado pela urina, e 1,6-dicloro-1,6-didesoxi-D-frutose

(1,6-DCF) que segue duas vias metabólicas: (i) redução em 1,6 dicloromanitol, com rápida excreção inalterada pela urina e (ii) conjugação com glutationa (GRICE e GOLDSMITH, 2000).

Jeffrey e Williams (2000) realizaram o ensaio de reparo de DNA em cultura de hepatócitos de ratos. Nas duas concentrações de sucralose utilizadas (2×10^{-1} M e 1×10^{-2} M) foi verificado ausência de genotoxicidade, fato que pode ser explicado pela falta de reatividade da sucralose com a molécula de DNA.

Sasaki et al. (2002) realizaram o ensaio cometa em camundongos com concentração máxima de 2000mg/kg e mostraram que a sucralose induziu quebra na cadeia de DNA, sugerindo atividade genotóxica do adoçante. Brusick et al. (2010) alertam para a elevada taxa de falso positivos encontrada nos resultados de Sasaki et al. (2002), o que leva a refletir que os resultados indicados para genotoxicidade no teste cometa não estejam, necessariamente, relacionados à carcinogenicidade.

Brusick et al. (2010) avaliaram a genotoxicidade *in vitro* por meio do Teste Ames de Mutação Reversa em *Salmonella typhimurium* e do Teste de Danos no DNA de *Escherichia coli*. Nos dois casos verificou-se que a sucralose não foi mutagênica e não danifica o DNA em microorganismos. Estes mesmos autores realizaram testes *in vivo*, com o teste que avalia danos cromossômicos em medula óssea de ratos, utilizando concentração máxima de 2000mg/kg e verificaram que a sucralose não apresenta comportamento tóxico e clastogênico. Ensaios de micronúcleo com ratos, também foram realizados por estes autores, com concentrações de 2000 a 10.000mg/kg e verificaram que a sucralose não apresentava comportamento clastogênico.

Demir et al. (2014) investigaram a genotoxicidade *in vivo* desse composto por meio do Teste de Avaliação da Mutação e Recombinação Somáticas (SMART), utilizando a *D. melanogaster* como organismo modelo. Os autores avaliaram também a genotoxicidade *in vitro*, por meio do teste cometa, analisando hemócitos de larvas de terceiro estágio. Os resultados nos dois procedimentos sugeriram que a sucralose é um agente não genotóxico para as concentrações de 5, 10, 25, 50 e 75mM.

O fato de a sucralose apresentar reduzida taxa de absorção gastrointestinal e acentuada eliminação por fezes, permite associar este fato à

ausência de danos ao DNA, tendo esta ocorrência sido confirmada por autores que mostraram a ausência de reatividade da sacarose com esta molécula. Estudos mostraram que a sacarose é metabolizada no trato gastrointestinal e que seus produtos são muito solúveis em água, evitando sua permanência neste trato, por elevado tempo. Os produtos gerados pela hidrólise da sacarose em meio ácido (4-CG e 1,6-DCF) e que são absorvidos, não conferem risco às células, uma vez que são eliminados pela urina ou se conjugarão com a molécula de glutationa (GRICE e GOLDSMITH, 2000).

Este nosso trabalho sugere que a ausência de potencial carcinogênico do adoçante sacarose, se deve ao fato de não possuir características genotóxicas, o que torna-se pouco provável sua interferência no ciclo celular a ponto de gerar alterações no índice mitótico e gerar tumor. Para estudos futuros seria interessante a investigação dos efeitos da molécula 1,6-DCF perante o conteúdo celular da glutationa, tendo em vista que esta molécula faz parte do sistema de defesa antioxidante e que a literatura indica conjugação entre essas duas moléculas.

Desde que foi desenvolvida, a sacarina sódica vem sendo alvo de diversas pesquisas sobre seus possíveis danos à saúde, perfazendo uma história com bastante controvérsia, o que motivou o Programa Internacional de Segurança Química a determinar a necessidade de constantes testes que avaliem a genotoxicidade *in vivo* e *in vitro* com o propósito de medir os parâmetros genéticos e interpretar os resultados correlacionando-os cuidadosamente ao homem (BANDYOPADHYAY et al., 2008).

Na década de 1970 houve o desenvolvimento do teste de carcinogenicidade utilizando ratos de duas gerações. Foi utilizada uma dieta com doses elevadas de sacarina sódica por longos períodos, resultando no desenvolvimento de tumores na bexiga nestes animais. Desde então, vem sendo questionada a segurança da sacarina sódica (CHAPPEL, 1992).

Fowler et al. (2012) realizaram teste de micronúcleo em diferentes linhagens *in vitro*. Na linhagem CHL, que consiste em uma sub-linhagem de fibroblastos derivados de pulmão de roedores, a concentração máxima de sacarina sódica utilizada (10mM) não induziu formação de micronúcleo, além de não exercer toxicidade; esta linhagem não apresentava níveis consideráveis de

p53. Além da linhagem CHL, também foi utilizada a linhagem TK6, constituída por células linfoblastoides humanas, a qual apresentou resultados semelhantes àqueles encontrados na linhagem CHL, porém a linhagem TK6 apresentava níveis consideráveis de p53.

Alguns ensaios *in vivo* também foram desenvolvidos. Bandyopadhyay et al. (2008) desenvolveram um ensaio cometa com células da medula de camundongos machos, com as concentrações de 50, 100 e 200 mg/kg e observaram indução de danos ao DNA, porém o efeito mutagênico foi considerado fraco.

Demir et al. (2014) realizaram testes *in vivo* com *D. melanogaster* por meio do SMART e do ensaio cometa avaliando a genotoxicidade da sacarina sódica nas seguintes concentrações: 5, 10, 25, 50 e 75mM. Em ambos os testes os resultados mostraram ausência de genotoxicidade em linhagens do organismo teste com níveis basais de CYP450. Tripathy et al (1994) realizaram o SMART, utilizando as concentrações de sacarina sódica de 50, 100 e 300mM, porém a linhagem do organismo teste apresentava níveis mais elevados de CYP450 e os resultados indicaram ausência de genotoxicidade.

Além de não estar relacionada ao desenvolvimento de tumores, estudos recentes têm mostrado que a sacarina sódica pode atuar na terapia anticâncer, freando o desenvolvimento e progresso dessa doença (D'ASCENZIO et al., 2014). Mahon et al. (2015) mostraram que, através da inibição da metaloenzima anidrase carboxilases IX (CA IX), ocorre redução no crescimento e na proliferação de tumores, além de melhorar os efeitos da quimioterapia e radioterapia. A CA IX é uma enzima transmembranar altamente expressa em tecidos tumorais, apresentando domínio catalítico extracelular, modulando o pH diferencial deste microambiente e garantindo a sobrevivência destas células (MAHON e MCKENNA, 2013). Os autores identificaram que a sacarina sódica liga-se ao grupo zinco presente no sítio catalítico da CA IX, inibindo naturalmente esta enzima.

O presente estudo sugere que a sacarina sódica não exerce influência carcinogênica sobre células somáticas de *D. melanogaster*. A ausência da carcinogenicidade pode ser atribuída à ação inibitória deste adoçante nos mecanismos presentes nesta mosca, que atuariam na garantia de sobrevivência

de clones de células epiteliais, como aqueles mecanismos exercidos pela CA IX. Além de não apresentar potencial carcinogênico, a literatura sugere um possível efeito anticarcinogênico, sendo interessante avaliar esse efeito em pesquisas futuras.

O glicosídeo de esteviol há muito vem sendo investigado, tendo em vista o seu metabolismo e a toxocologia na qual seus metabólitos estão envolvidos. Ele é quimicamente definido como uma mistura com, no mínimo de 95% de esteviosídeo e/ou rebaudiosídeo A, com quantidades menores de rebausídeos B, C, D, E e F, esteviolside, rubusoside e dulcoside A (ROBERTS e RENWICH, 2008). A absorção do glicosídeo de esteviol é bastante reduzida, desde sua ingestão e ao ser hidrolisado pela microflora do cólon ocorre a liberação de esteviol (KOYAMA et al, 2003). Existem alguns relatos de ocorrência de genotoxicidade envolvendo o esteviol e seus derivados oxidativos, em estudos *in vitro* e *in vivo*.

Nunes et al. (2007) realizaram um ensaio *in vivo* crônico utilizando o teste cometa em células provenientes do fígado, cérebro e baço de ratos. O esteviosídeo indicou comportamento não genotóxico; porém, o esteviol induziu danos ao DNA, sendo considerado genotóxico.

Tendo em vista a semelhante farmacocinética do esteviosídeo e do rebaudiosídeo A, Williams e Burdock (2009) avaliaram especificamente o rebudiosídeo A, utilizando os mesmos testes empregados em trabalhos anteriores, nos quais avaliaram apenas o esteviosídeo. Os resultados encontrados com o rebaudiosídeo A e com o esteviosídeo foram semelhantes no teste Ames, onde foi constatada a ocorrência de aberração cromossômica em células de mamíferos e micronúcleo em ratos.

O trabalho de Abdel-Tawab et al. (2000), no qual foi avaliado o potencial mutagênico do glicosídeo de esteviol em *D. melanogaster*, mostrou que este composto não apresenta propriedades mutagênicas. Associado a esta informação Abdel-Tawab et al. (2012) avaliaram este mesmo adoçante neste mesmo organismo modelo; porém, observando o seu potencial carcinogênico nas concentrações de 4, 12 e 20mg/mL e foi verificado ausência de carcinogenicidade exercida pelo adoçante.

López et al. (2016) mencionam que o extrato etanólico de *Stevia rebaudiana*, contendo glicosídeo de esteviol, exerce atividade antiproliferativa e antioxidante, eliminando radicais livres em linhagens de células HeLa, HCT116 e MiaPaCa-2.

Os resultados do presente experimento sugerem que o glicosídeo de esteviol não apresenta efeito carcinogênico em *D. melanogaster*. A propriedade antioxidante deste composto pode justificar a ausência de mutagenicidade. Com esta propriedade aliada a ação antiproliferativa do glicosídeo de esteviol, torna-se pouco provável a geração significativa de tumores. Para estudos futuros, seria relevante investigar estas propriedades antiproliferativa e antioxidante em experimentos *in vivo*, com diferentes organismos modelos.

O presente estudo sugere que, nas condições experimentais em que trabalhamos, nas concentrações testadas e utilizando o teste de detecção de clones de tumores epiteliais no organismo modelo *D. melanogaster*, não foi possível detectar indução significativa de tumor pelos adoçantes aspartame, sucralose, sacarina sódica e glicosídeo de esteviol.

Tabela 1. Frequências de clones de tumores observadas em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), controle negativo (água) e com diferentes concentrações de aspartame (AS) (0,85; 1,7; 3,4; 6,8 e 13,6mM).

Tratamento	N. de moscas (N)	Frequência de tumores analisados (total de tumores)										Total
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter					
Água	200	0,01 (2)	0,01 (2)	0,08 (16)	0,02 (4)	0,03 (5)	0,01 (1)	0,15 (30)				
DXR 0,4 mM	200	0,01 (2) -	0,41 (81) +	3,92 (784) +	0,97 (193) +	0,24 (48) +	0,05 (9) +	5,59 (1117) +				
AS 0,85 mM	200	0,05 (9) -	0,03 (6) -	0,04 (7) -	0,04 (8) -	0,04 (7) -	0,00 (0) -	0,19 (37) -				
AS 1,7 mM	200	0,05 (9) -	0,06 (12) -	0,05 (9) -	0,02 (4) -	0,06 (12) -	0,00 (0) -	0,23 (46) -				
AS 3,4 mM	200	0,03 (6) -	0,04 (7) -	0,03 (6) -	0,05 (9) -	0,02 (4) -	0,01 (1) -	0,17 (33) -				
AS 6,8 mM	200	0,03 (5) -	0,04 (7) -	0,02 (3) +	0,03 (5) -	0,05 (10) -	0,01 (1) -	0,16 (31) -				
AS 13,6 mM	200	0,02 (3) -	0,03 (6) -	0,04 (8) -	0,04 (8) -	0,02 (4) -	0,01 (2) -	0,16 (31) -				

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney Test. Nível de significância $P \leq 0.05$

+ Valor considerado diferente do controle negativo ($P \leq 0.05$).

DXR, doxorrubicina.

Tabela 2. Frequências de clones de tumores observadas em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), controle negativo (água) e com diferentes concentrações de sucralose (Sucra) (0,5; 1,25; 2,5; 5,0 e 10mM).

Tratamento	N. de Moscas (N)	Frequência de tumores analisados (total de tumores)																			
		Olho		Cabeça		Asa		Corpo		Perna		Halter		Total							
Água	200	0,01	(02)	0,01	(02)	0,08	(16)	0,02	(04)	0,03	(05)	0,01	(01)	0,15	(30)						
DXR 0,4 mM	200	0,01	(02)	-	0,41	(81)	+	3,92	(784)	+	0,97	(193)	+	0,24	(48)	+	0,05	(09)	+	5,59	(1117)+
Sucra 0,5 mM	200	0,01	(02)	-	0,04	(07)	-	0,05	(10)	-	0,03	(05)	-	0,04	(08)	-	0,01	(01)	-	0,17	(33)-
Sucra 1,25 mM	200	0,00	(00)	-	0,03	(05)	-	0,01	(02)	-	0,06	(11)	-	0,03	(06)	-	0,00	(00)	-	0,12	(24)-
Sucra 2,5 mM	200	0,01	(02)	-	0,02	(04)	-	0,05	(10)	-	0,04	(08)	-	0,04	(07)	-	0,01	(01)	-	0,16	(32)-
Sucra 5,0 mM	200	0,02	(04)	-	0,01	(02)	-	0,07	(13)	-	0,04	(08)	-	0,03	(06)	-	0,00	(00)	-	0,17	(33)-
Sucra 10,0 mM	200	0,04	(07)	-	0,04	(08)	-	0,06	(12)	-	0,03	(06)	-	0,01	(01)	-	0,01	(01)	-	0,18	(35)-

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney Test. Nível de significância $P \leq 0.05$

+ Valor considerado diferente do controle negativo ($P \leq 0.05$).

DXR, doxorrubicina.

Tabela 3. Frequências de clones de tumores observadas em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), controle negativo (água) e com diferentes concentrações de sacarina sódica (Sac) (25; 50; 100; 200 e 400mM).

Tratamento	N. de Moscas (N)	Frequência de tumores analisados (total de tumores)										Total
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter					
Água	200	0,00 (00)	0,07 (13)	0,09 (18)	0,20 (40)	0,04 (07)	0,01 (02)	0,40 (80)				
DXR 0,4 mM	200	0,06 (11) +	0,97 (194) +	4,15 (830) +	2,25 (450) +	1,67 (334) +	0,32 (63) +	9,41 (1882) +				
Sac 25 mM	200	0,03 (05) -	0,06 (11) -	0,10 (19) -	0,08 (15) -	0,04 (08) -	0,01 (01) -	0,30 (59) -				
Sac 50 mM	200	0,00 (00) -	0,06 (11) -	0,07 (14) -	0,08 (16) -	0,03 (06) -	0,01 (01) -	0,24 (48) -				
Sac 100 mM	200	0,01 (02) -	0,07 (13) -	0,07 (13) -	0,05 (09) -	0,05 (10) -	0,00 (00) -	0,24 (47) -				
Sac 200 mM	200	0,01 (01) -	0,06 (11) -	0,05 (10) -	0,13 (26) -	0,03 (06) -	0,01 (01) -	0,28 (55) -				
Sac 400 mM	200	0,00 (00) -	0,06 (11) -	0,05 (10) -	0,09 (18) -	0,03 (06) -	0,02 (03) -	0,24 (48) -				

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney Test. Nível de significância $P \leq 0.05$

+ Valor considerado diferente do controle negativo ($P \leq 0.05$).

DXR, doxorrubicina.

Tabela 4. Frequências de clones de tumores observadas em *Drosophila melanogaster*, heterozigota para o gene supressor de tumor *wts*, tratadas com controle positivo (DXR 0,4mM), controle negativo (água) e com diferentes concentrações de glicosídeo de estevio (SG) (2,5; 5,0; 10,0; 20,0 e 40,0mM).

Tratamento	N. de Moscas (N)	Frequência de tumores analisados (total de tumores)								Total
		Olho	Cabeça	Asa	Corpo	Perna	Halter			
Água	200	0,00 (00)	0,03 (06)	0,06 (12)	0,10 (20)	0,03 (06)	0,01 (01)	0,23	(45)	
DXR 0,4 mM	200	0,02 (03) -	0,76 (152)+	2,74 (548)+	1,61 (321)+	0,83 (165)+	0,31 (61)+	6,25	(1250)+	
SG 2,5 mM	200	0,00 (00) -	0,05 (09) -	0,08 (15) -	0,09 (18) -	0,02 (03) -	0,01 (02) -	0,24	(47) -	
SG 5,0 mM	200	0,01 (01) -	0,07 (13) -	0,06 (12) -	0,12 (24) -	0,04 (07) -	0,01 (01) -	0,29	(58) -	
SG 10,0 mM	200	0,01 (01) -	0,06 (11) -	0,06 (12) -	0,10 (20) -	0,05 (09) -	0,00 (00) -	0,27	(53) -	
SG 20,0 mM	200	0,00 (00) -	0,05 (10) -	0,07 (13) -	0,12 (23) -	0,04 (08) -	0,01 (01) -	0,28	(55) -	
SG 40,0 mM	200	0,00 (00) -	0,05 (09) -	0,07 (14) -	0,06 (12) -	0,04 (07) -	0,01 (02) -	0,22	(44) -	

Diagnóstico estatístico de acordo com o Teste de Mann-Whitney Test. Nível de significância $P \leq 0.05$

+ Valor considerado diferente do controle negativo ($P \leq 0.05$).

DXR, doxorrubicina.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Tawab, F. M., Allam, A. I., El-Seoudy, A. A., Awad, A. A. M., Abdel-Gawad, N. M., Abo-doma, H. A., 2000. Assessment of the genetic effects of stevioside on some biological systems; In:The Second Arab Conf. *Genet. Biotec.* Minia Univ. Oct.23-26.
- Abdel-Tawab, F. M., Allam, A. I., 2012. Enhancement of sugar production by modern biotechnological methods; In:International Conference on: New Role for the World Sugar Economy in a Changed Political and Economic Environment. Nov. 10-13. Aswan, Egypt.
- Alsuhaibani, E.S., 2010. In Vivo Cytogenetic Studies on Aspartame. Comparative and Functional Genomics, 1-4.
- Awney, H.A., 2011. Oxidative stress biomarkers in young male rats fed with stevioside. African Journal of Biochemistry Research 5, 333-340.
- Bandyopadhyay, A., Ghoshal, S., Mukherjee, A., 2008. Genotoxicity Testing of Low-Calorie Sweeteners: Aspartame, Acesulfame-K, and Saccharin. Drug and Chemical Toxicology 31, 447–457.
- Baran, E.J., Yilmaz, V.T., 2006. Metal complexes of saccharin. Coordination Chemistry Reviews 250, 1980–1999.
- Barbet-Massin, C., Giuliano, S., Alletto, I., Daydé, J., Berger, M., 2015. Nitrogen Limitation Alters Biomass Production but Enhances Steviol Glycoside Concentration in *Stevia rebaudiana Bertoni*. Plos One, 1-16.
- Bootman, J., Lodge, D.C., 1981. 1,6-Dichloro-1,6-dideoxyfructose: Assessment of its mutagenic potential in *Drosophila melanogaster*, using the six-linked recessive lethal test. Unpublished report from Life Science Research., Essex, U.K. Submitted to the World Health Organization by Tate & Lyle.
- BRASIL, 1994. Lei 8918 de 14 de Julho de 1994. Portal da Legislação – Governo Federal. <http://www.planalto.gov.br/legisacao> – acesso: 09/05/2016.
- Brusick, D., Grotz, V. L., Slesinski, R., Kruger, C. L., Hayes, A.W., 2010. The absence of genotoxicity of sucralose. Food and Chemical Toxicology 48, 3067–3072.
- Catharino, R.R., Santos, L. S., 2012. On-line monitoring of stevioside sweetener hydrolysis to steviol in acidic aqueous solutions. Food Chemistry 133, 1632–1635.
- ChappeL, C. I., 1992. A Review and Biological Risk Assessment of Sodium Saccharin. Regulatory Toxicology and Pharmacology 15, 253-270.

Chung, Y.S., Lee, M., 2013. Genotoxicity Assessment of Erythritol by Using Short-term Assay. *Toxicol. Res.* 29, 249-255.

D'Ascenzo, M., Carradori, S., De Monte, C., Secci, D., Ceruso, M., SUPURAN, C.T., 2014. Design, synthesis and evaluation of N-substituted saccharin derivatives as selective inhibitors of tumor-associated carbonic anhydrase XII. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 22, 1821–1831.

Demir, E., Turna, F., Kaya, B., Creus, A., Marcos, R., 2013. Mutagenic/recombinogenic effects of four lipid peroxidation products in *Drosophila*. *Food Chem. Toxicol.* 53, 221-227.

Demir, E., Turna, F., Aksakal, S., Kaya, B., Marcos, R., 2014. Genotoxicity of Different Sweeteners in *Drosophila*. *Fresenius Environmental Bulletin* 23, 3426-3432.

Fowler, P., Smith, K., Young, J., Jeffrey, L., Kirkland, D., Pfuhler, S., Carmichael, P., 2012. Reduction of misleading ("false") positive results in mammalian cell genotoxicity assays. I. Choice of cell type. *Mutation Research* 742,11– 25.

Gewirtz, D. A., 1999. A critical evaluation of the mechanisms of action proposed for the anthacycline antibiotics andriamycin and daunorubicin. *Biochem. Pharmacol.* 57, 727-741.

Grice, H.C., Goldsmith, L.A., 2000. Sucralose – an overview of the toxicity data. *Food Chem. Toxicol.* 38,1–6.

Horio, Y., Sun, Y., Liu, C., Saito, T., Kurasaki, M., 2014. Aspartame-induced apoptosis in PC12 cells. *Environmental Toxicology and Pharmacology* 37, 158-165.

Jagadeesh, S., 2011. The Influence of Dietary Factors on Reproduction in the Fruit Fly, *Drosophila melanogaster*. Masters dissertation - University of Toronto.

Jeffrey, A.M., Williams, G.M., 2000. Lack of DNA-damaging Activity of Five Non-nutritive Sweeteners in the Rat Hepatocyte/DNA Repair Assay. *Food and Chemical Toxicology* 38, 335-338.

Justice, R. W., Zilian, O., Woods, D. F., Noll, M., Bryant, P. J., 1995. The *Drosophila* tumor suppressor gene warts encodes a homolog of human myotonic dystrophy kinase and is required for the control of cell shape and proliferation. *Genes & Development* 9, 534-546.

Kaiserová, H., Den Hartog, G. J. M., Simunek, T., Schröterová, L., Kvasnicková, E., Bast, A., 2006. Iron is not involved in oxidative stress-mediated cytotoxicity of doxorubicin and bleomycin. *British Journal of Pharmacology* 149, 920-930.

Kamath, S., Vijaynarayana, K., Shetty, D.P., Shetty, P., 2010. Evaluation of Genotoxic Potential of Aspartame. *Pharmacologyonline* 1, 753-769.

Koyama, E., Sakai, N., Ohori, Y., Kitazawa, K., Izawa, O., Kakegawa, K., Fujino, A., Ui, M., 2003. Absorption and metabolism of glycosidic sweeteners of stevia mixture and their aglycone, steviol, in rats and humans. *Food Chem. Toxicol.* 41, 875-883.

Kroger, M., Meister, K., Kava, R., 2006. Low-calorie Sweeteners and Other Sugar Substitutes: A Review of the Safety Issues. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 5, 35-47.

Lima, J. S., Dias, M. C., Matencio,T., 2010. Aplicação da espectroscopia no infravermelho e difração de reaio-X na determinação de sacarina em adoçantes líquidos artificiais pelo método volumétrico com Ag⁺. *Ecl. Quím. São Paulo* 35, 25- 32.

Lok, K.Y.W., Chung, W.Y., Iris, F.F., 2010. Colour additives in snack foods consumed by primary school children in Hong Kong. *Food Addit Contam* 3, 148–155.

López, V., Pérez, S., Vinuesa, A., Zorzetto, C., Abian, O., 2016. Stevia rebaudiana ethanolic extract exerts better antioxidant properties and antiproliferative effects in tumour cells than its diterpene glycoside stevioside. *Food Funct.* 7, 2107–2113.

Louzada, M.L.C., Martins, A.P.B., Canella, D.S., Baraldi, L. G., Levy, R.B., Claro, R.M., Moubarac, J., Cannon, G., Monteiro, C.A., 2015. Ultra-processed foods and the nutritional dietary profile in Brazil. *Revista de Saúde Pública* 49.

Mahon, B.P., Mckenna, R., 2013. *Res. Trends Curr..Top. Biochem. Res.* 15.

Mahon, B.P., Hendon, A.M., Driscoll, J.M., Rankin, G.M., Poulsen, S., Supuran, C.T., Mckenna, R., 2015. Saccharin: A lead compound for structure-based drug design of carbonic anhydrase IX inhibitors. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 23, 849–854.

Marinovich, M., Gall, C.L., Bosetti, C., Gallus, G., Vecchia, C.L., 2013. Aspartame, low-calorie sweeteners and disease: Regulatory safety and epidemiological issues. *Food and Chemical Toxicology* 60, 109–115.

Monteiro, C.A., Mourarac, J.C., Cannon, G., Ng, S.W., Popkin, B., 2013. Ultra-processed products are becoming dominant in the global food system. *Obes Rev.* 14, 21-28.

Molinary. S., Quinlan., M.E., 2006. Sucralose. In: Mitchell H, editor. *Sweeteners and sugar alternatives in food technology*. Oxford, UK: Blackwell Publishing Ltd, 130–145.

Nepomuceno, J.C., 2015. Using the *Drosophila melanogaster* to Assessment Carcinogenic Agents through the Test for Detection of Epithelial Tumor Clones (Warts). *Adv Tech Biol Med* 3, 1-8.

- Nunes, A.P.M., Ferreira-Machado, S.C., Nunes, R.M., Dantas, F.J.S., de Mattos. J.C.P., Caldeira-de-Araújo, A., 2007. Analysis of genotoxic potentiality of stevioside by comet assay. Food and Chemical Toxicology 45, 662–666.
- Rencüzogullari, E., Tüylü, B.A., Topaktas, M., Ila, H.B., Kayraldiz, A., Arslan, M., Diler, S.B., 2004. Genotoxicity of Aspartame. Drug and Chemical Toxicology 27, 257-268.
- Roberts, A., Renwick, A.G., 2008. Comparative toxicokinetics and metabolism of rebaudioside A, stevioside, and steviol in rats. Food and Chemical Toxicology 46, 31–39.
- Sasaki, Y.F., Kawaguchi, S., Kamaya, A., Ohshita, M., Kabasawa, K., Iwama, K., Taniguchi, K., Tsuda, S., 2002. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. Mutat. Res. 519, 103–119.
- Schernhammer, E.S., Bertrand, K.A., Birnbaum, B.M., Sampson, L., Willett, W.C. Feskanich, D., 2012. Consumption of artificial sweetener- and sugar-containing soda and risk of lymphoma and leukemia in men and women. Am J Clin Nutr. 96, 1419–28.
- Tollefsen, K.E., Nizzetto, L., Huggett, D.B., 2012. Presence, fate and effects of the intense sweetener sucralose in the aquatic environment. Science of the Total Environment 438, 510–516.
- Tripathy, N.K., Mishra, R., Anandkumar, A., Sahu, G.P., 1994. Lack of Genotoxicity of Saccharin and Sodium Saccharin studied in the wing spot and sex-linked recessive lethal tests. Rev. Int. Contam. Ambient. 10, 89-98.
- Whysner, J., Williams, G.M., 1996. Saccharin Mechanistic Data and Risk Assessment: Urine Composition, Enhanced Cell Proliferation, and Tumor Promotion. Pharmacol. Ther. 71, 225-252.
- Williams, L.D., Burdock, G.A., 2009. Genotoxicity studies on a high-purity rebaudioside A preparation. Food and Chemical Toxicology 47, 1831–1836.
- Xu, T., Wang, W., Zhang, S., Stewart, R.A., Yu, W., 1995. Identifying tumor suppressors in genetic mosaics: the *Drosophila lats* gene encodes a putative protein kinase. Development 121, 1053–1063.
- Yilmaz, S., Uçar, A., 2014. A review of the genotoxic and carcinogenic effects of aspartame: does it safe or not?. Cytotechnology. DOI 10.1007/s10616-013-9681-0.