



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ - UFPI  
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS  
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - MODALIDADE LICENCIATURA

Josefa Janaína dos Anjos Sousa

**TOXICIDADE DO CORANTE ALIMENTAR PONCEAU 4R (E-124) EM CÉLULAS  
DE SISTEMA-TESTE VEGETAL**

PICOS, PIAUÍ

2013

Josefa Janaína dos Anjos Sousa

**TOXICIDADE DO CORANTE ALIMENTAR PONCEAU 4R (E-124) EM CÉLULAS  
DE SISTEMA-TESTE VEGETAL**

Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

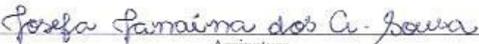
Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Peron.

PICOS, PIAUÍ

2013

Eu, **Josefa Janaína dos Anjos Sousa**, abaixo identificado(a) como autor(a), autorizo a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação abaixo discriminada, de minha autoria, em seu site, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, a partir da data de hoje.

Picos-PI, 07 de julho de 2014.

  
Assinatura

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí**  
**Biblioteca José Albano de Macêdo**

**S725t** Sousa, Josefa Janaína dos Anjos.,  
Toxicidade do corante alimentar ponceau 4R (E – 124) /  
Josefa Janaína dos Anjos Sousa. – 2013.  
CD-ROM : il; 4 ¼ pol. (30 p.)

Monografia(Licenciatura em Ciências Biológicas) –  
Universidade Federal do Piauí. Picos-PI, 2013.  
Orientador(A): Profa. Dra. Ana Paula Peron

1. Corante Azo. 2. Citotoxicidade. 3. Genotoxicidade.  
4. Allium Cepa L. 5. Ponceau 4R. I. Título.

**CDD 664.07**

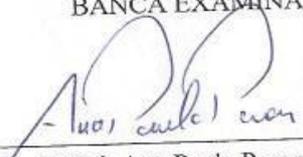
Josefa Janaína dos Anjos Sousa

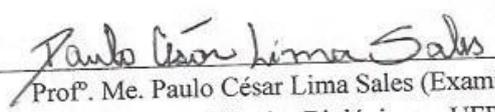
**TOXICIDADE DO CORANTE ALIMENTAR PONCEAU 4R (E-124) EM CÉLULAS  
DE SISTEMA-TESTE VEGETAL**

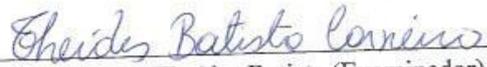
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí,  
Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do grau  
de Licenciado em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 17 / 09 / 13

BANCA EXAMINADORA

  
Profª. Drª. Ana Paula Peron (Orientadora)  
Curso de Ciências Biológicas – UFPI

  
Profº. Me. Paulo César Lima Sales (Examinador)  
Curso de Ciências Biológicas – UFPI

  
Profº. Me. Theides Batista (Examinador)  
Curso de Nutrição - UFPI

Ao meu pai, **Francisco Manoel** (*in memoriam*)  
que já não posso ver, mas posso sentir... Sei que  
hoje onde estiver sente-se muito feliz, pois este  
era um dos seus maiores sonhos, a ti dedico essa  
vitória!!!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus**, por doar-me a vida, por toda força e paciência que me proporcionaste nos momentos difíceis permitindo assim superar os obstáculos que surgiram ao longo desse percurso e a conclusão de mais uma etapa essencial em minha vida.

Aos meus pais, **Francisco Manoel** (*in memoriam*) e **Maria Filomena** pelo exemplo de vida, por todo apoio, dedicação e acima de tudo por abdicar dos seus sonhos em prol dos meus... Amo-os!!!

À minha Orientadora Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. **Ana Paula Peron**, pessoa em que me espelho muito, por todo apoio, paciência, compreensão, por sua presença constante e principalmente por sempre ter acreditado em mim!

Aos meus irmãos, **Caio** e **Julim**, pelo incentivo, compreensão e confiança em mim depositada, vocês foram armas fundamentais nessa conquista!

As minhas companheiras de casa, **Mel, Paty, Rayane e Vanessa**, por estarem junto comigo nessa conquista, pelo ótimo convívio, pelas confidências, pelas conversas jogadas fora, por cada minuto compartilhado... Um pedacinho de vocês sempre irá me acompanhar: uma lembrança, uma brincadeira, e até mesmo uma bronca... Só tenho a agradecer por fazerem parte da minha vida... Amo-as!!!

Aos meus colegas de curso, em especial a **Eliane Dantas, Francisco José, Laís Raquel e Cintya Matias**, pelo companheirismo vivido, pela correria de cada final de período, pelos obstáculos superados juntos... Obrigado por tornarem os meus dias mais felizes!!!

Aos amigos em geral por me acompanharem nesta caminhada e permanecerem ao meu lado nos altos e baixos dessa jornada.

A todos que compõem o Núcleo de Pesquisa Aplicada a Saúde e ao Meio-ambiente (NUPBSAM). Em especial aos alunos **Gleuvânia Marques, Ronielson Carvalho e Elifran Dantas** pelo auxílio durante a realização de todas as etapas essenciais neste trabalho, pelo carinho, paciência, amizade enfim por estarem sempre presentes quando necessitei de ajuda.

**MUITÍSSIMO OBRIGADO!**

Aos mestres pelos ensinamentos repassados, as dúvidas esclarecidas, pela amizade e paciência que para conosco tiveram.

A Todos que direta ou indiretamente contribuíram para essa conquista, meu muito **OBRIGADO!!!**

Nunca considerem seu estudo como uma obrigação,  
mas sim como uma oportunidade invejável de aprender,  
sobre a influência libertadora da beleza no domínio  
do espírito, para seu prazer pessoal e para o proveito  
da comunidade à qual pertencerá o seu trabalho futuro.

*(Albert Einstein)*

## RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade do corante alimentar Ponceau 4R(E-124) sobre as células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L., em três concentrações: 0,25; 0,50 e 0,75 g/L, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas. Para cada concentração utilizou-se um grupo de cinco bulbos de cebolas, que primeiramente foram enraizados em água destilada, e em seguida transferidos para as suas respectivas concentrações. As radículas foram coletadas e fixadas em ácido acético (3:1) por 24 horas. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética a 2%. Analisaram-se células em todo ciclo celular, totalizando 5.000 para cada controle e tempo de exposição. Os índices mitóticos calculados e as aberrações celulares observadas foram submetidos à análise estatística do Qui-quadrado ( $p < 0,05$ ). A partir dos resultados observou-se que as concentrações 0,25 e 0,50g/L, no tempo de exposição de 48h, e a concentração 0,75g/L nos dois tempos de exposição avaliados foram citotóxicas as células do sistema teste em questão. Todas as três concentrações, nos dois tempos de exposição analisados, foram genotóxicas. É importante que outros estudos de avaliação de toxicidade sejam conduzidos para se somar a este e aos já relatados na literatura científica, para assim estabelecer com propriedade o real potencial tóxico do corante alimentar Ponceau 4R em nível celular.

**PALAVRAS-CHAVES:** corante azo, citotoxicidade, genotoxicidade, ponceau 4R, *Allium cepa* L.

**ABSTRACT:**

This study aimed to evaluate the toxicity of food coloring Ponceau 4R on the cell cycle in meristematic cells of *Allium cepa* L. roots in three concentrations: 0.25, 0.50 and 0.75g/L, in times of exposure of 24 to 48 hours. For each concentration used a group of five onion bulbs that were first embedded in distilled water and then transferred to their respective concentrations. The radicles were collected and fixed in acetic acid (3:1) for 24 hours. The slides were prepared by the crushing technique and stained with 2% acetic orcein. Cells were analyzed throughout the cell cycle, totaling 5000 for each control and exposure time. The calculated mitotic indices were subjected to the Chi-squared statistical analysis ( $p < 0.05$ ). From the results it was observed that concentrations 0.25 and 0.50 g/L at 48 hours ET, and the concentration 0.75 g/L were evaluated for both ET cytotoxic cells of the test system in question. All three concentrations were analyzed in the two ET considered genotoxic. It is important that other studies of toxicity assessment is conducted to add to this and already reported in the scientific literature, so as to properly establish the real potential toxic food coloring Ponceau 4R at the cellular level.

**KEY WORDS:** azo dye, cytotoxicity, genotoxicity, ponceau 4R, *Allium cepa* L.

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>18</b>
<b>3.1-Obtenção do Corante Ponceau 4R (E-124) e Definição das</b> <b>Concentrações.....</b>	<b>18</b>
<b>3.2-Obtenção das Células Meristemáticas para a Análise Citogenética.....</b>	<b>18</b>
<b>3.3-Preparo e Leitura das Lâminas, e Análise dos Dados.....</b>	<b>19</b>
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>20</b>
<b>5 CONCLUSÃO.....</b>	<b>24</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>25</b>

## LISTA DE TABELA

- Tabela 01** – Número de células em intérfase e em diferentes fases da divisão celular, total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com o corante Ponceau 4R nas concentrações de 0, 25; 0,50 e 0,75 g/L, nos tempos de exposição 24 e 48 horas..... **21**
- Tabela 02** – Número total células analisadas, Número de células micronucleadas, ampliações gênicas e pontes anáfasicas e telofásicas, e total de células aberrantes encontradas em cada controle e nas concentrações de 0, 25; 0,50 e 0,75 g/L do corante Ponceau 4R, nos tempos de exposição 24 e 48 horas..... **22**

## 1 INTRODUÇÃO

Na indústria alimentícia muitos aditivos são utilizados com o intuito de potencializar os aspectos sensoriais e a aceitabilidade dos alimentos pela população. Como exemplo, pode-se citar os corantes alimentares sintéticos, aditivos que não agregam valor nutritivo, mas influenciam diretamente na aceitação do consumidor por restaurarem ou intensificarem a cor dos alimentos (SILVA; NEED, 2011). No entanto, estes corantes não são recomendados por especialistas da área da saúde em função de contribuírem para o empobrecimento da dieta e por, muitas vezes, causarem efeitos adversos ao organismo (CHEESEMAN, 2012).

Os corantes do grupo azo, classe de corantes orgânicos sintéticos que proporcionam cores mais vivas aos alimentos, possuem em sua composição um anel naftaleno ligado a um anel benzeno por uma ligação azo ( $N=N$ ), e o Ponceau 4R, também conhecido na indústria alimentícia como New Coccine, Food Red e Coccine Red, é um representante desta classe (PAN et al., 2011). Este corante proporciona cor vermelha, é comercializado em pó, possui grande estabilidade na presença de luz, calor e ácidos em geral, e tem boa solubilidade em água (PARK et al., 2009). É muito utilizado na coloração de balas, pastilhas, confeitos, balas de goma, balas de gelatina, gelatinas, chicletes, bebidas a base de soja, bebidas não alcoólicas gaseificadas e em quase todos os produtos diet (FAVERO et al., 2011).

Em âmbito mundial, o controle para a utilização de corantes alimentares baseia-se na Ingestão Diária Aceitável (IDA) que tem como base os resultados de pesquisas e as recomendações do Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) (GANESAN et al., 2011). No Brasil, a permissão de utilização e fixação de níveis máximos toleráveis de aditivos alimentares é de responsabilidade da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) em parceria com o Ministério da Saúde (MS), que realizam esta atividade por meio da Comissão Permanente de Aditivos Alimentares (CPAA) (BRASIL, 2013; FENG et al., 2012). De acordo com Brasil (2013), a IDA estabelecida para o corante Ponceau 4R é de 0,10 mg/kg.

Apesar dos limites exigidos, a utilização de corantes sintéticos em alimentos ainda suscita uma série de dúvidas quanto a sua toxicidade (FENG et al., 2012; Yadav et al., 2013).. No caso do Ponceau 4R, de acordo com Hamerski et al., (2013), já se sabe que este aditivo pode causar hipersensibilidade na pele, anemia severa e hiperatividade em crianças, e glomerulonefrite em crianças e adultos. Porém, estes mesmos autores relatam a urgente necessidade de estudos que avaliem com propriedade a real toxicidade deste corante em nível celular. Segundo Prado e Godoy (2007), estas avaliações são de extrema importância em

função de estabelecerem o potencial de compostos químicos em causar citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade, condições estas que podem contribuir grandemente para o desenvolvimento de câncer.

Os bioensaios com plantas têm sido considerados bastantes sensíveis, rápidos e simples no monitoramento dos efeitos tóxicos em nível celular de compostos químicos (USEPA) (IGANCI et al., 2006) e as células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* (cebola) têm sido indicadas como um eficiente organismo teste vegetal para este tipo de avaliação (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2009) por suas propriedades cinéticas de proliferação, por possuir cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ) o que facilita a sua análise (HERRERO et al., 2012), por permitir a verificação de alterações no índice de divisão celular (índice mitótico) e de aberrações celulares (TABREZ et al., 2011), e por demonstrar similaridade satisfatória aos resultados obtidos com outros bioensaios, como os com animais e em cultura de células (GERAS`KIN et al., 2011).

Geras`kin et al. (2011), Fachinneto e Tedesco (2009) e Peron et al. (2008) citam que mesmo que o metabolismo das plantas seja diferente aos de animais, os resultados obtidos por meio deste sistema teste são bons parâmetros de análise de toxicidade em nível celular, e tem sido muito utilizado para alertar a população sobre o consumo de alguns alimentos e de alguns medicamentos sintéticos e naturais.

Assim, devido a grande utilização do corante Ponceau 4R pela indústria de alimentos, pela necessidade de estudos adicionais avaliando os efeitos tóxicos deste aditivo em nível celular, e considerando o sistema *A. cepa* como um bioensaio adequado para avaliação de toxicidade de compostos químicos, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade deste corante alimentar sobre as células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

De acordo com o item 1.2 da Portaria SVS/MS 540/97 aditivo é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente aos alimentos com o objetivo de modificar suas características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais (durante sua fabricação, processamento, preparação, tratamento, embalagem, acondicionamento, armazenamento, transporte ou manipulação) sem o propósito de nutrir (BRASIL, 2002).

Antes de ser autorizado o uso de um aditivo, deve ser feita a adequada avaliação toxicológica, considerando qualquer efeito cumulativo, sinérgico ou de proteção. Os aditivos alimentares devem ser mantidos sob observação e ser reavaliados periodicamente, conhecendo-se sempre as informações científicas que surjam sobre esse tema. Não interessa apenas as propriedades específicas que os convertem em aditivo alimentar, mas também todas as suas ações colaterais e contraindicações (SALINAS, 2002).

Existem cerca de seis mil aditivos utilizados pela indústria alimentícia, sendo que mais da metade são aromas, tanto naturais quanto sintéticos. Os outros são corantes, conservantes, antioxidantes e emulsificantes. Entre esses os corantes sempre tiveram um aspecto vital para escolha e aceitação dos alimentos (PRADO; GODOY, 2007). Muitos alimentos industrializados originalmente não apresentam cor, e em outros a cor natural pode ser alterada durante o processo de produção. Em face dessa realidade, a utilização de corantes pela indústria alimentícia é justificada pela melhor aceitação dos produtos pelos consumidores com a adição de corantes, devido ao aspecto visual. Porém, esses aditivos não são totalmente inofensivos à saúde humana (PRADO; GODOY, 2004).

Os corantes artificiais são uma classe de aditivos sem valor nutritivo, introduzidos nos alimentos e bebidas com o único objetivo de conferir cor, tornando-os mais atrativos. Devido esse motivo, do ponto de vista da saúde, os corantes artificiais em geral não são indicados, justificando seu uso, quase que exclusivamente, do ponto de vista comercial e tecnológico (RIEDEL, 1987).

Sob o ponto de vista toxicológico, vários estudos têm sido realizados para verificar os efeitos nocivos ao homem, já que esses aditivos não são totalmente inócuos à saúde. Assim, os corantes artificiais são alvos das investigações científicas devido às reações adversas que alguns consumidores podem apresentar (PRADO; GODOY, 2003). Dessa forma, no Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), vinculada ao Ministério da Saúde, permite a utilização de corantes não naturais em produtos alimentícios, com limites máximos

de utilização, por ser possível a presença de toxicidade após a utilização desses produtos (KAPOR et al., 2001).

Em âmbito mundial, o *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives* (JECFA), baseado em dados experimentais, tem a missão de sugerir, ou não, o uso de determinado aditivo. Quando recomendam o uso, o JECFA também deve estabelecer o valor da Ingestão Diária Aceitável (IDA) para cada aditivo (ARAÚJO, 2000). Segundo a FAO/WHO, a Ingestão Diária Aceitável ou IDA de uma substância, expressa em mg/kg de peso corpóreo/dia, é definida como a quantidade de substância que, ingerida diariamente e durante a vida pelo homem, parece não oferecer riscos à saúde humana, à luz dos conhecimentos toxicológicos atuais.

No Brasil, permite-se o uso de onze corantes artificiais em produtos alimentícios, sendo eles: amarelo tartrazina (CI 19140), amarelo crepúsculo (CI 15985), amaranto (CI 16185), ponceau 4R (CI73015), vermelho 40 (CI 16035), azul de indigotina (CI 73015), azul brilhante FCF (CI 42090), azul patente V (CI 42051), azorrubina (CI 14720) e verde rápido (CI 42053).

As pesquisas nessa área, além de alertar sobre os limites de tolerância dos corantes permitidos, já proibiu a utilização de alguns corantes sintéticos em todo o mundo, como o amarelo sólido (antigamente empregado em gelatinas); o laranja GGN, (antigamente usado em sorvetes), o vermelho sólido (antigamente usado em recheios e revestimentos de biscoitos), o azul de alizarina (antigamente usado em óleos emulsionados e gelatinas) e o escarlate GN (antigamente usado em recheios de confeitarias) (MEINICKE, 2008).

De acordo com a ANVISA, nos países que permitem a utilização do aditivo alimentar, vermelho ponceau 4R, a ingestão diária aceitável (IDA) é de 0,10mg/Kg enquanto que o limite máximo é de 10mg/100g. O ponceau 4R antigamente era obtido do alcatrão de carvão, mas atualmente é sintetizado a partir de hidrocarbonetos do petróleo, assim como muitos outros corantes sintéticos. O mesmo é utilizado industrialmente na produção de uma grande variedade de alimentos como balas, doces, refrescos, bebidas enlatadas; na coloração de alguns medicamentos e até mesmo no tingimento de tecidos (DOMINGOS; GARRET, 2013).

Este aditivo alimentar apresenta boa estabilidade ao calor, à luz e ao ácido, descolore parcialmente na presença de alguns agentes redutores como o ácido ascórbico e SO<sub>2</sub> (PRADO; GODOY, 2003). A estrutura básica deste corante é composta por dois anéis nftaleno sulfonados conectados por um grupo azo (-N=N-). Por isso, esta substância pertence à classe de corantes azóicos, a mais importante classe entre os corantes sintéticos de alimentos (DOMINGOS; GARRET, 2013).

Uma pesquisa publicada por Stevenson e colaboradores mostraram que misturas de aditivos, comumente achadas em alimentos, que continham os corantes amarelo crepúsculo, azorrubina, tartrazina, ponceau 4R, amarelo quinoleína e vermelho 40, quando administrada em alimentos infantis, causava aumento da hiperatividade em crianças nas idades de 3 a 9 anos. Os autores demonstraram que o uso destes aditivos acentua comportamentos como desatenção e impulsividade.

Ainda existem muitas incertezas a respeito do emprego de aditivos alimentares, entre eles, os corantes artificiais, como os responsáveis pelo aparecimento do transtorno do déficit de atenção e hiperatividade. Alguns estudos evidenciaram melhora no quadro clínico da hiperatividade quando as crianças foram submetidas a uma dieta isenta dessas substâncias. Porém, é preciso melhorar a metodologia de confirmação diagnóstica para que a criança não seja submetida sem necessidade a uma dieta de exclusão de forma inadequada. Os corantes que mais se destacam nas alterações do comportamento humano são tartrazina, amaranto, ponceau 4R, eritrosina e caramelo amoniacal (PERES, 2009).

Inúmeros estudos assinalam reações adversas aos aditivos alimentares, quer seja aguda ou crônica, tais como reações tóxicas no metabolismo desencadeantes de alergias, alterações comportamentais e carcinogenicidade (observada a longo prazo) (PERES, 2009). Porém, os estudos sobre os possíveis danos causados pelos corantes artificiais à saúde ainda são insuficientes e bastante contraditórios (PRADO; GODOY, 2003).

Em virtude disso o aditivo alimentar ponceau 4R necessita de mais estudos sobre sua toxicidade a fim de que se possa determinar com segurança os seus reais efeitos no organismo humano e dessa forma possa confrontar com dados já relatados. Nos últimos anos foram realizadas inúmeras pesquisas sobre a toxicidade de vários compostos importantes, mediante a utilização de organismos teste em vários biotestes de toxicidade. A mais valia destes testes está relacionada com a sua simplicidade e alto grau de reprodutibilidade. (NILSSON, 1989; NICOLAU et al., 2004). Xie et al. (2012), relatam, com base em alguns poucos trabalhos realizados na década de 60 e 80, que o corante Ponceau 4R em concentrações elevadas e por longo tempo de exposição é carcinogênico, teratogênico e mutagênico.

De acordo com Erdtmann et al. (2003) a genotoxicidade é uma área da genética que estuda os processos que alteram a base genética da vida, quer seja numa estrutura físico-química, o DNA, processo esse chamado de mutagênese; quer seja na alteração do determinismo genético celular ou orgânico, identificados, respectivamente, como carcinogênese ou teratogênese .

Dentre os vegetais superiores utilizados como modelos-teste, a espécie de *Allium cepa* vem se destacando como um eficiente modelo genético de monitoramento ambiental. A espécie é indicada pela sua elevada sensibilidade e excelente correlação com outros sistemas-teste, principalmente com os de mamíferos. Estes fatores são relevantes para avaliação mais minuciosa de riscos ambientais, bem como para análise de outros organismos alvos, como, por exemplo, o homem (FISKESJÖ, 1985). A indicação de toxicidade é observada pela inibição do crescimento das raízes e pelos efeitos adversos causados aos cromossomos (FISKESJÖ, 1995).

O *Allium cepa* vem sendo usado para avaliar danos no DNA (aberrações cromossômicas e distúrbios no ciclo mitótico) para determinados tipos de bioensaios. O vegetal é usado para este tipo de análise desde a década de 40 até os dias atuais, avaliando agentes químicos, contribuindo para a sua aplicação crescente no monitoramento ambiental. Os testes com essa espécie têm mostrado uma correlação de 82% deste teste com o de carcinogenicidade em roedores devido a sua alta sensibilidade (LEME; MARIN-MORALES, 2007). Segundo Matsumoto e Marin-Morales (2004) *apud* Amaral (2007) o uso de *A. cepa* se dá pelo fato de que são fáceis de serem armazenadas, manuseadas e as células da raiz constituem um sistema conveniente tanto para parâmetros macroscópicos (crescimento, deformidade), quanto para parâmetros microscópicos (aberrações cromossômicas).

Os bioensaios com plantas têm sido considerados bastantes sensíveis e simples no monitoramento dos efeitos citotóxicos de compostos químicos (USEPA) (IGANCI et al., 2006) e a *A. cepa* (cebola) tem sido indicada como um eficiente organismo-teste vegetal para avaliação de citotoxicidade (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008) em função, entre outras características, de suas propriedades cinéticas de proliferação, por possuir cromossomos grandes e em número reduzido ( $2n=16$ ), o que facilita a sua análise na detecção de danos à estrutura da molécula de DNA (MATSUMOTO et al., 2006; HERRERO et al., 2012) e na verificação de alterações no índice de divisão celular (índice mitótico), como aumento ou redução da proliferação das células de tecidos que estão em exposição a compostos químicos de interesse (TABREZ et al., 2011), e por demonstrar similaridade satisfatória aos resultados obtidos com outros bioensaios como os realizados com animais e em cultura de células (ARUNG et al., 2011; NUNES et al., 2011; GERAS'KIN et al., 2011).

Os resultados de testes de toxicidade utilizando a espécie *A. cepa* ressaltam a importância deste sistema-teste, pois o mesmo apresenta resultados semelhantes aos obtidos com outros bioensaios. É também importante salientar, como mencionado por Vicentini et al. (2001), Peron, Marcu e Vicentini (2008) e Fachinetto et al. (2009), que mesmo que o

metabolismo das plantas seja diferente ao de animais, os resultados obtidos por meio deste sistema-teste são excelentes parâmetros de análise citotóxicas, e a observação da ocorrência de alterações cromossômicas no ciclo celular dessa espécie tem sido utilizado como um indicador para alertar as pessoas sobre o consumo de determinados alimentos e medicamentos sintéticos e naturais.

Portanto o sistema teste-vegetal de *Allium cepa* é de grande relevância uma vez que possibilita a avaliação de mutagenicidade, citotoxicidade e genotoxicidade objetivando identificar os efeitos tóxicos e as alterações cromossômicas ocorridas ao longo de um ciclo celular em diversos compostos químicos, como por exemplo, em corantes sintéticos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Animal do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí, Município de Picos, Estado do Piauí, no período de maio a setembro de 2013.

#### 3.1 Obtenção do corante Ponceau 4R(E-124) e definição das concentrações

O corante Ponceau 4R (E-124) puro foi adquirido de uma distribuidora especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos localizada na região nordeste do Brasil. Cada frasco do corante continha 50g do produto, e, conforme descrito no rótulo, recomendava-se diluir 0,25g de Ponceau em 1L de água, concentração esta recomendada pela maioria das indústrias brasileiras responsáveis pela fabricação deste corante.

Dessa forma, neste trabalho a primeira concentração estabelecida foi de 0,25g/L. A segunda e a terceira concentração foram estabelecidas duplicando e triplicando a quantidade de Ponceau 4R da primeira concentração, 0,50g/L e 0,75 g/L.

#### 3.2 Obtenção de células meristemáticas de raízes de *A. cepa* para a análise citogenética

As cebolas foram colocadas para enraizar em frascos com água destilada, à temperatura ambiente ( $\pm 25^{\circ}\text{C}$ ) e aerada, até a obtenção de raízes com cerca de 2,5 cm de comprimento. Para análise de cada concentração estabeleceu-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebola.

Antes de se colocar as raízes em contato com as suas respectivas soluções, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle (CO) do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em suas respectivas concentrações, por 24 horas, procedimento este denominado de tempo de exposição de 24 horas (TE 24h).

Após este tempo foram retiradas algumas raízes e fixadas. Feito este procedimento, as raízes restantes de cada bulbo foram devolvidas as suas respectivas soluções onde permaneceram por mais 24 horas, o que se denominou de tempo de exposição de 48 horas (TE 48h). Após este período, raízes novamente foram coletadas e fixadas. Os tempos de exposição de 24 e 48h foram escolhidos com o intuito de se avaliar a ação destas três concentrações em mais de um ciclo celular.

No frasco de cada bulbo em estudo foram colocados 30 ml de sua respectiva concentração, tendo-se o cuidado de verificar se todas as raízes estavam em contato adequado com a solução em estudo. A fixação das raízes se deu em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), a temperatura ambiente, por 24 horas. Para cada coleta de raiz, retirou-se, em média, três raízes por bulbo.

### 3.3 Preparo e leitura das lâminas, e análise estatística dos dados

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002). Cada lâmina foi corada com duas gotas deorceína acética a 2% e analisada em microscópio óptico, em objetiva de 40X. Para cada bulbo analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada controle e tempo de exposição.

Foram observadas células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Foi calculado o número de células em intérfase e em divisão de cada controle e tempo de exposição e determinado o índice mitótico. Avaliou-se também o potencial genotóxico das concentrações por meio do número de células micronucleadas, de metáfases colchícinicas, pontes anáfasicas e telofásicas, ampliações gênicas, células com aderências, brotos nucleares e anáfases multipolares. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste do Qui-quadrado ( $\chi^2$ ), com nível de probabilidade  $<0.05$ , por meio do software estatístico BioEstat 3.0 (2007).

#### 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Segundo Rutkunas et al. (2012), os estudos sobre os efeitos adversos em nível celular causados pelos corantes sintéticos à saúde, principalmente os da classe azo, são insuficientes e bastante contraditórios, e a quase totalidade destas avaliações são sobre os corantes Tartrazina, Vermelho Bordeaux e Amarelo Crepúsculo, o que justifica, ainda mais, a realização de estudos sobre a ação do Ponceau 4R em nível celular.

Neste trabalho (Tabela 01), verificou-se que as concentrações de 0,25 e 0,50g/L de Ponceau 4R, no TE 48h, tiveram uma redução estatisticamente significativa do IM quando comparado ao IM obtidos para os seus respectivos CO e TE 24h, mostrando-se citotóxicas. Já os índices de divisões celulares obtidos para o CO e TE 24h destas duas concentrações não diferiram de forma significativa entre si.

Para a concentração 0,75g/L deste corante (Tabela 01) foi observado que os IM obtidos nos TE 24 e 48h foram estatisticamente diferentes em relação ao IM do seu respectivo controle, ocorrendo nestes dois tempos de exposição uma redução significativa da divisão celular. Dessa forma, esta concentração, nos dois TE, também foi considerada citotóxica as células do sistema teste em questão. Porém, os IM obtidos para os seus TE não foram significativos entre si. A partir destes resultados, é importante destacar que a inibição da divisão celular ocorreu já na concentração menor, de 0,25g/L, concentração esta sugerida pelo fabricante no frasco do corante utilizado para a realização deste trabalho. Também é importante enfatizar que o índice de divisão celular, em todas as três concentrações, diminuiu drasticamente conforme o aumento do TE.

Tabela 01 - Número de células em intérfase e em diferentes fases da divisão celular no ciclo celular de pontas de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com o corante Ponceau 4R nas concentrações de 0,25; 0,50 e 0,75g/L, nos tempos de exposição 24 e 48 horas. Foram analisadas 5.000 células para cada CO e TE. Picos (PI), 2013.

Ponceau 4R (g/L)	TE	Células				Células		IM (%)
		em Intérfase	P	M	A	T	em Divisão	
	CO	3163	1284	178	174	201	1837	36,7 <sup>a</sup>
0,25	24h	3388	1227	119	105	161	1612	32,2 <sup>a</sup>

	48h	4421	465	19	16	79	579	11,6 <sup>b</sup>
	CO	3841	834	151	70	104	1159	23,2 <sup>a</sup>
0,50	24h	3826	969	123	64	08	1164	23,3 <sup>a</sup>
	48h	4511	451	22	12	04	489	9,8 <sup>b</sup>
	CO	3688	822	284	88	118	1312	26,2 <sup>a</sup>
0,75	24h	4291	400	133	85	91	709	14,2 <sup>b</sup>
	48h	4608	215	69	53	55	392	7,8 <sup>b</sup>

CO – Controle; TE – Tempo de exposição; h – hora; P – prófase; M – metáfase; A – Anáfase; T – Telófase; IM – Índice Mitótico.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste do  $\chi^2$ .

Em relação às aberrações celulares (Tabela 02) todas as três concentrações estudadas, nos dois TE avaliados, apresentaram um número estatisticamente significativo de aberrações celulares em relação aos seus respectivos controles, mostrando-se, portanto, genotóxicas. Dentro de cada concentração o número de aberrações observadas em cada TE não foram significativos entre si. As aberrações observadas foram: micronúcleos, ampliações gênicas, pontes anafásicas e pontes telofásicas.

Tabela 02 – Número total células analisadas, células micronucleadas, ampliações gênicas e pontes anafásicas e telofásicas, e número total de células aberrantes encontradas em cada controle e nas concentrações de 0,25; 0,50 e 0,75g/L do corante Ponceau 4R, nos tempos de exposição 24 e 48 horas. Foram analisadas 5.000 células para cada CO e TE. Picos (PI), 2013.

Concentração (g/L)	TE	Micronúcleo	Amplificações gênicas	Pontes metafásicas e telofásicas	Total de células aberrantes
	CO	00	00	00	00 <sup>a</sup>
0,25	24h	19	31	23	73 <sup>b</sup>

	48h	22	21	29	72 <sup>b</sup>
	CO	00	00	00	00 <sup>a</sup>
0,50	24h	34	22	29	85 <sup>b</sup>
	48h	28	17	27	72 <sup>b</sup>
	CO	00	00	00	00 <sup>a</sup>
0,75	24h	20	20	45	85 <sup>b</sup>
	48h	45	20	34	99 <sup>b</sup>

CO – Controle; TE – Tempo de exposição.

Médias seguidas da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste do  $\chi^2$ .

Segundo Rutkunas et al. (2012), os estudos sobre os efeitos adversos em nível celular causados pelos corantes sintéticos à saúde, principalmente os da classe azo, são insuficientes e bastante contraditórios, e a quase totalidade destas avaliações são sobre os corantes Tartrazina, Vermelho Bordeaux e Amarelo Crepúsculo, o que justifica, ainda mais, a realização de estudos sobre a ação do Ponceau 4R em nível celular.

Shimada et al. (2010) avaliaram, por meio do Teste do Cometa, a ação do Ponceau 4R, nas concentrações de 1 e 10 mg/kg e em tratamento crônico, sobre as células de medula óssea de camundongos e ratos Wistar, e verificaram que a concentração maior provocou danos significativos as moléculas de DNA destes organismos, mostrando-se genotóxica. Xie et al. (2012), relataram, com base em alguns poucos trabalhos realizados na década de 60 e 80, que o corante Ponceau 4R em concentrações elevadas e por longo tempo de exposição é carcinogênico, teratogênico e mutagênico. No entanto, apesar das constatações feitas por estes autores, estes foram os dois únicos relatos encontrados na literatura científica sobre a ação deste corante em nível celular.

Freitas (2012) relata que na década de 90 o corante Ponceau 4R foi motivo de discussão no setor alimentício mundial em função da escassez de estudos que comprovassem a sua inocuidade ao organismo humano. Esta polêmica fez com que alguns estados do Japão e dos Estados Unidos restringissem o uso deste corante em alimentos industrializados. No entanto, no Brasil, o uso deste aditivo nunca foi restringido, mesmo com a carência de estudos sobre a sua toxicidade. Esta situação é preocupante, visto que este mesmo autor afirma que a quase totalidade dos alimentos industrializados consumidos pelos brasileiros atualmente são constituídos por corantes azo, com ênfase aos corantes Tartrazina, Vermelho 40 e Ponceau 4R.

Corroborando a citação feita por Freitas (2012), Polônio e Peres (2009) ressaltam que apesar dos órgãos regulamentadores nacionais estabelecerem limites para o uso de corantes alimentares, os mesmos não controlam quanto de fato às indústrias alimentícias acrescentam destes aditivos aos alimentos e de quanto às indústrias de fabricação destes corantes sugerem que se acrescente destes aditivos aos alimentos. Este relato pode ser verificado a partir de um estudo feito por Prado e Godoy<sup>11</sup>, onde avaliaram os teores de corantes artificiais em alimentos por cromatografia líquida e verificaram que a quase totalidade dos corantes alimentares artificiais utilizados pela indústria de alimentos no Brasil, e dentre eles o corante Ponceau 4R, apresentam teores acima dos permitidos pela legislação brasileira. Relatam ainda que grande parte dos alimentos industrializados importados comercializados no Brasil não atende a legislação brasileira quanto aos limites permitidos de corantes alimentares.

Dessa forma, todo corante alimentar deve ser mantido sob observação e ser reavaliado periodicamente sobre as células de vários organismos de prova, como em mamíferos, plantas e cultura *in vitro* de células, em várias concentrações e tempos de exposição, com o intuito de auxiliar os órgãos regulamentadores, e adequar, se preciso for, o seu uso.

De acordo com Polônio e Peres (2009), estas avaliações, além de alertar sobre os limites de tolerância dos corantes permitidos, já proibiu a utilização de alguns corantes sintéticos em todo o mundo, como o amarelo sólido (antigamente empregado em gelatinas); o laranja GGN, (antigamente usado em sorvetes), o vermelho sólido (antigamente usado em recheios e revestimentos de biscoitos), o azul de alizarina (antigamente usado em óleos emulsionados e gelatinas) e o escarlata GN (antigamente usado em recheios de confeitarias) em função destes aditivos terem apresentado citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade em vários sistemas testes.

## 5 CONCLUSÃO

Nas condições analisadas, as concentrações 0,25 e 0,50g/L, no TE 48h, bem como a concentração 0,75g/L, nos TE 24 e 48h, foi citotóxicas as células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. Todas as concentrações analisadas foi genotóxicas as células do sistema teste utilizado.

Outros estudos de avaliação de toxicidade em nível celular utilizando outros sistemas testes devem ser conduzidos para se somar a este e aos outros já realizados, e assim estabelecer de forma satisfatória o real potencial tóxico em nível celular do corante alimentar Ponceau 4R observado neste estudo.

Espera-se que estes resultados desperte o interesse de outros pesquisadores em avaliar a ação deste corante em nível celular.

## REFERÊNCIAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 25 mai, 2013.

AMARAL, A. et al. Avaliação preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade, da água da bacia do rio Tapanhon (SP-Brasil) através do teste *Allium* (*Allium cepa*). **Revista Brasileira de Toxicologia**. v.20, p.65-72, 2007.

ARAÚJO, M. C. P.; ANTUNES, L. M. G. **Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos**. *Rev. Nutr.* v.13, p.81-88, 2000.

ARUNG, E. T. et al. Melanin biosynthesis inhibitory and antioxidant activities of quercetin-3'-O-beta-D-glucose isolated from *Allium cepa*. **Zeitschrift fur Naturforschung C Journal of biosciences**, v.66, p. 209-14, 2011.

AYRES, M. et al. **BioEstat 5.0 - Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas: Sociedade Civil Mamirauá, Belém**. CNPq: Brasília, 2007.

BRASIL, ANVISA. **Portaria 590/47, de 27 de Outubro de 1997**. (DOU de 28/10/1997) Disponível em :<http://www.anvisa.gov.br> 2002a. Acesso em 10 jul. 2013.

BRASIL, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC n 217, de 29 de Julho de 2005**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2005/rdc/21705rdc.pdf>. Acesso em : 22 jun. 2013.

CARITÁ R.; Marin-Morales M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere** v.72, p.722-725, 2008.

CHEESEMAN, M. A. Artificial food color additives and child behavior. **Environmental Health Perspectives**, v. 20, p.15-16, 2012.

DIXIT S. et al. Usage pattern and exposure assessment of food colours in different age groups of consumers in the State of Uttar Pradesh, INDIA. **Food Addit Contam Part A Chem Anal Control Expo Risk Assess.** v.27, p.181-189, 2010.

DOMINGOS, H.; GARRET, R. **Química Nova Interativa** (Sociedade Brasileira de Química, 2013). Disponível em:< <http://qnint.s bq.org.br/qni/popup>>. Acesso em: 28 jul. 2013.

ERDTMANN B. **A genotoxicidade nossa de cada dia.** In: Silva, J. Erdtmann, B. Henrique, J. A. P Genética Toxicológica. Porto Alegre: Alcance, p.23-46, 2003.

FACHINETTO, J. M.; TEDESCO, S. B. Atividade antiproliferativa e mutagênica dos extratos acuosos de *Baccharis trimera* (Less.) A. P. de Candolle *Baccharis articulata* (Lam.) Pers. (Asteraceae) sobre o sistema teste de *Allium cepa*. **Rv. Bras. Pl. Med.**; v.11, p.360-367, 2009.

FAVERO, D. M.; RIBEIRO, C. S. G.; AQUINO, A. D. Sulfitos: importância na indústria alimentícia e seus possíveis malefícios à população. **Segurança Alimentar e Nutricional**, v. 18, p.11-20, 2011.

FENG, J.; CERNIGLIA, C. E.; CHEN, H. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v.1, p.568-86, 2012.

FERNANDES, T. C. C. **Investigação dos Efeitos Tóxicos, Mutagênicos e Genotóxicos do Herbicida Trifluralina, utilizando *Allium cepa* e *Oreochromis niloticus* como Sistemas - Testes.** Dissertação de Mestrado. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” (UNESP). Rio Claro. p.211, 2005.

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

FISKEJÖ, G. *Allium* test. **Methodological and Molecular Biology.** v.43, p.119-127, 1995.

FREITAS, A. S. **Tartrazina: uma revisão das propriedades e análises de quantificação.** Acta Tecnológica, v.7, p.67-72, 2012.

GANESAN, L. et al. The food colorant erythrosine is a promiscuous protein-protein interaction inhibitor. **Biochemical Pharmacology**, v.81, p.810-818, 2011.

GERAS`KIN, S. et al. Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means *Allium* test. **Chemosphere**, v.83, p.1133-46, 2011.

GERAS`KIN S. et al. Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means *Allium* test. **Chemosphere** v.83, p.1133-1146, 2011.

GONÇALVES, E. C. B. A. et al. Avaliação do consumo de corantes artificiais por lactentes, pré-escolares e escolares. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, 2008.

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana.** Ribeirão Preto: FUNPEC, 2002.

HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v.743, p.24-34, 2012.

IGANCI, J. R. V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.73, p. 79-82, 2006.

KAPOR, M. A. et al. Eletroanálise de Corantes Alimentícios: determinação de índigo Carmim e Tartrazina. 2001.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. **Avaliação da Qualidade de Águas Impactadas por Petróleo por Meio de Sistema-Teste Biológico (*Allium cepa*) - Um Estudo de Caso.** Universidade Estadual Paulista (UNESP). 4o PDPETRO, Campinas, SP, p.21-24. 2007.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v.82, p.71-81. 2009.

MATSUMOTO, S.T.; MARIN-MORALES, M.A. Mutagenic potential of the water of a river that receives tannery effluent using the *Allium cepa* test system. **Cytologia**. V.69, p. 399-408, 2004.

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberration in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**, v.29, p. 148-58, 2006.

MEINICKE, R. M. **Estudo da produção de pigmentos por *monascus Ruber cct 3802* utilizando glicerol como substrato em cultivo submerso** Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina Florianópolis, 2008.

NICOLAU A., MOTA M. & LIMA N. Effect of different toxic compounds on ATP content and acid phosphatase activity in axenic cultures of *Tetrahymena pyriformis*. **Ecotoxicology and Environmental Safety**. v.57, p.129-135, 2004.

NILSSON J. R. *Tetrahymena* in Citotoxicology: with special reference to effects of heavy metals and selected drugs. **Eur. J. Protistol**. v.25, p.2-25, 1989.

NUNES, E. A. et al. Genotoxic assessment on river water using different biological systems. **Chemosphere**, v.84, p.47-53, 2011.

PERON, A. P. et al. Avaliação do potencial citotóxico dos chás de *Camellia sinensis* L.. e *Cassia angustifolia vahl* em sistema teste vegetal. **Arquivas de Ciências da Saúde da Unipar**, v.12, p.1-10, 2008.

PERES, F.; POLÔNIO, M. L. T. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.25, p.8, 2009.

POLÔNIO, M. L. T.; Peres, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira Food additive intake and health effects: public health challenges in Brazil. **Cad. Saúde Pública**, v.25,p.1653-1666, 2009.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Synthetic dyes in foods. **Alim. Nutr.**, Araraquara, v.14, p. 237-250, 2003.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Determinação de corantes artificiais por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) em pó para gelatina. **Química Nova**. v.27, p.22-26, 2004.

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. **Química Nova**, V.30, P.268-273, 2007.

RIEDEL, G. Controle sanitário dos alimentos. São Paulo: Loyola, p.445, 1987.

RUTKUNAS, V. et al. Effects of different food colorants and polishing techniques on color stability of provisional prosthetic material. **Dental Materials Journal**, v.29, p.167-176, 2010.

SALINAS, R. D. **Alimentos e nutrição: introdução a bromatologia**. trad. Fátima Murad.3.ed, Porto Alegre: Artmed, 2002.

SILVA, N. O.; Reed, E. ESTUDO SOBRE CORANTES ARTIFICIAIS EM ALIMENTOS: QUAIS OS RISCOS MAIS COMUNS PELO CONSUMO EXCESSIVO. **Cadernos de Educação, Tecnologia e Sociedade**, v.2, 2011.

SHIMADA, C. et al. Differential colon DNA damage induced by azo food additives between rats and mice. **J Toxicol Sci**. v.35, p.547-54, 2010.

STEVENSON, J. et al. Food additives and hyperactive behaviour in 3-year-old and 8/9-year-old children in the community: a randomized, double-blinded, placebo-controlled trial. **The Lancet**, v.370, p.1560-1567, 2007.

TABREZ, S. et al. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an over view of the techniques and their efficacies. **Environmental Carcinogenesis Ecotoxicology Review**, v.29, p.250-75, 2011.

VICENTINI, V. E. P. et al. *Averrhoa carambola* L., *Syzygium cumini* L. Skeels and *Cissus sicyoides* L.: medicinal herbal tea effects on vegetal and test systems. **Acta Scientiarum**, v. 23, p.593-598, 2001.

Tonetto, A. et al. **O Uso de Aditivos de Cor e Sabor em Produtos Alimentícios**. 2008.

World Health Organization. **Evaluation of certain food additives and contaminants**. World Health Organ Tech Rep Ser. V.966, p.1-136, 2011.

XIE Y. et al. Theoretical calculation (DFT), Raman and surface-enhanced Raman scattering (SERS) study of ponceau 4R. *Spectrochim Acta A Mol Biomol Spectrosc.* 2012 Oct; v.96, p.600-4, 2012.