



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

ANTONIO GABRIEL GOMES DE MOURA

**CITOTOXICIDADE DE AROMATIZANTES ALIMENTARES
ASSOCIADOS EM SISTEMA TESTE *in vivo***

PICOS, PIAUÍ
2014

ANTONIO GABRIEL GOMES DE MOURA

**CITOTOXICIDADE DE AROMATIZANTES ALIMENTARES
ASSOCIADOS EM SISTEMA TESTE *in vivo***

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^ª. Dr^ª. Ana Paula Peron.

PICOS, PIAUÍ
2014

ANTONIO GABRIEL GOMES DE MOURA

**CITOTOXICIDADE DE AROMATIZANTES ALIMENTARES
ASSOCIADOS EM SISTEMA TESTE *in vivo***

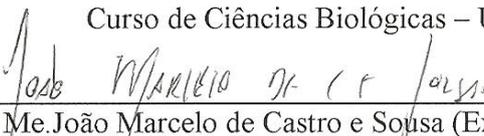
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 17/07/2014

BANCA EXAMINADORA



Prof.ª Dr. Ana Paula Peron (Orientadora)
Curso de Ciências Biológicas – UFPI



Prof. Me. João Marcelo de Castro e Sousa (Examinador)
Curso de Ciências Biológicas – UFPI



Prof. Me. Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima (Examinador)
Curso de Ciências Biológicas – UFPI

Eu, **Antônio Gabriel Gomes de Moura**, 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, 16 de Setembro de 2014.

Antônio Gabriel Gomes de Moura

Assinatura

FICHA CATALOGRÁFICA

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

M929c Moura, Antônio Gabriel Gomes de.
Citotoxicidade de aromatizantes alimentares utilizados em sistema teste vegetal / Antônio Gabriel Gomes de Moura. – 2014.
CD-ROM : il; 4 ¾ pol. (27 p.)

Monografia(Licenciatura em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí. Picos-PI, 2014.
Orientador(A): Profa. Dra. Ana Paula Peron

1. Aditivo Alimentar. 2. Aromatizante. 3. Citotoxicidade. 4. Sistema Teste Vegetal. I. Título.

CDD 664

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por estar sempre presente ao meu lado nessa jornada, por toda paciência, sabedoria, perseverança e por ter me dado forças para encarar os diversos obstáculos encontrados durante minha graduação.

À minha família, por ter acreditado que eu era capaz e todo sacrifício sofrido para eu estar aqui hoje, em especial aos meus pais, Ana Maria Gomes Leal e Jocione Carlos de Moura pela perseverança à minha educação e por terem deixado de lado os seus interesses em favor dos meus, a minha irmã Lana Jessica Gomes de Moura, a qual sem ela aqui do meu lado, tudo teria sido mais difícil.

À Prof^a. Dr^a. Ana Paula Peron, pela orientação, colaboração, paciência e atenção para que eu pudesse desenvolver este trabalho.

Aos amigos da universidade, que sempre estiveram presentes nas horas boas e difíceis, com muita alegria e cumplicidade e pelos grandes momentos de descontração, em especial a Darciela Moura, Ronielson Carvalho, Adriano, Jodson, Leonides, Louridânia e Maria Laurentina, Patricia, Poliana, Rafaela, Paulinha e Ila sempre lembrarei das boas risadas que demos juntos.

Aos meus amigos de infância Denilson Nunes, Italo Rossini e aos amigos que adquiri durante essa jornada, Celso Rocha, Thertuliano Fernandes, Vinicius Andrade, Eugenio Melo e Amsterdam Miranda, que sempre me apoiaram e aconselharam quando eu estava com a cabeça quente por conta dos estudos, pelos momentos de alegria que me fizeram esquecer os problemas da vida.

Aos meus companheiros de laboratório, Gleuvânia e Ellifran, muito obrigado por toda a ajuda. Vocês foram peças fundamentais na conclusão desse trabalho.

Aos mestres pelos ensinamentos repassados, as dúvidas esclarecidas, pela amizade e paciência.

E a todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para essa conquista, meu muito

OBRIGADO!

"Não consulte seus medos, mas suas esperanças e sonhos. Não pense sobre suas frustrações, mas sobre seu potencial não desenvolvido. Não se preocupe com os fracassos, acredite naquilo que você ainda realizará."

(Papa João XXIII)

RESUMO

Os aromatizantes alimentares são de grande importância para a indústria alimentícia por possuírem propriedades aromáticas e/ou sápicas, capazes de conferir ou reforçar o aroma e o sabor dos alimentos sem o propósito de nutrir. Porém, apesar de sua importância e necessidade, a sua utilização em alimentos ainda suscita uma série de dúvidas quanto a sua citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, visto que, na literatura, existe uma escassez de trabalhos avaliando a toxicidade, em nível celular, destes compostos químicos. Desta forma este trabalho teve por objetivo avaliar individualmente a toxicidade em nível celular de aromatizantes alimentares sintéticos, idênticos aos naturais, de sabores Queijo e Queijo Cheddar, nas doses de 1,0 e 2,0 ml, e nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, e associados, utilizando 0,5ml do aromatizantes sabor Queijo associado a 0,5ml do aromatizante sabor Queijo Cheddar; e 1,0ml do aromatizantes sabor Queijo associado a 1,0ml do aromatizante sabor Queijo Cheddar, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas. Para estas avaliações utilizou-se grupos de cinco bulbos de cebolas, que primeiro foram enraizados em água destilada, e em seguida transferidos para as suas respectivas doses. 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 ($p < 0,05$). Não foram observadas alterações cromossômicas e anomalias para os dois aromatizantes estudados. A partir dos resultados obtidos verificou-se que tanto individualmente como de forma associada, os aromatizantes em estudos reduziram de forma significativa os índices de divisões celulares das células do sistema teste utilizado. Portanto, nas condições analisadas, os dois aromatizantes foram citotóxicos.

PALAVRAS-CHAVE: aditivo alimentar; aromatizantes; citotoxicidade; sistema-teste vegetal.

ABSTRACT

The flavorings are of great importance to the food industry for having aromatic and / or sapid properties, able to confer or enhance the food's aroma and taste without the purpose of nourishment. However, despite their importance and necessity, their use in food still raises a number of questions regarding its cytotoxicity, mutagenicity and carcinogenicity, since in the literature there is a paucity of studies evaluating the toxicity at the cellular level, in these chemical compounds. Therefore, this study aimed to evaluate individually the toxicity at a cell level of synthetic food flavorings identical to natural, cheese and Cheddar cheese flavors, in doses of 1.0 and 2.0 ml, and exposure times of 24 and 48 hours and associated, using 0.5 ml of flavoring Cheese flavor associated with 0.5 ml of flavoring Cheddar flavor; and 1.0 ml of flavoring Cheese flavor associated with 1.0 ml of flavoring Cheddar flavor in exposure times of 24 and 48 hours. For these evaluations, we used five groups of onion's bulbs, which were first rooted in distilled water and then transferred to their respective doses. The rootlets were collected and fixed in acetic acid (3:1) for 24 hours. The slides were prepared by crushing method and stained with 2% acetic orcein. Cells were analyzed throughout the cell cycle, totalizing 5,000 for each control and exposure time. The calculated mitotic index and cellular aberrations observed were submitted to statistical analysis using the chi-square test ($p < 0.05$). No chromosomal abnormalities and anomalies for both flavoring studied were observed. From the obtained results, it was found that both individually and associated, flavor studies significantly reduced the rate of cell division in the cells of the test system used. Thus, under the conditions studied, the two flavorings were cytotoxic.

KEYWORDS: food additive; flavoring; cytotoxicity; plant test system

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

QUADRO 01 - Classes de Aditivos Alimentares	13
--	----

LISTA DE TABELAS

TABELA 01 - Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de <i>Allium cepa</i> tratadas com 1,0 e 2,0 ml do aromatizante alimentar sabor Queijo nos TE 24 e 48 horas.....	20
TABELA 02 - Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de <i>Allium cepa</i> tratadas com 1,0 e 2,0 ml do aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar nos TE 24 e 48 horas.....	21
TABELA 03 - Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de <i>Allium cepa</i> tratadas com 0,5ml de aromatizante sabor Queijo associada a 0,5ml de aromatizante sabor Queijo Cheddar; e 1,0ml de aromatizante sabor Queijo associado a 1,0ml do aromatizante sabor Queijo Cheddar, nos TE 24 e 48 horas.....	22

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 Obtenção dos aromatizantes alimentares e definição das doses de estudo.....	18
3.2 Obtenção de células meristemáticas para a análise citogenética.....	18
3.3 Preparo, leitura das lâminas e análise dos dados	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO.....	24
REFERÊNCIAS.....	25

1 INTRODUÇÃO

Aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado intencionalmente, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais dos alimentos. São imprescindíveis para a indústria alimentícia, desempenhando as funções de conservar, colorir, aromatizar e garantir a uniformidade destes produtos (VELOSO et al., 2009). São representados pelos conservantes (antioxidantes e antimicrobianos), acidulantes, emulsificantes, estabilizantes, espessantes, umectantes, anti-umectantes, corantes e aromatizantes (ANVISA, 2007).

Os aromatizantes possuem propriedades sensoriais que caracterizam o sabor e o aroma dos mais diversos tipos de alimentos (CONSTANT et al., 2007). Sua formulação é altamente complexa, constituída de diluentes, antioxidantes, antiespumantes, conservantes, emulsificantes, estabilizantes, reguladores de acidez, realçadores de sabor, anti-umectantes, antiaglutinantes, corantes, e de solventes de extração e processamento, e regulamentada mundialmente pela European Food Safety Authority (EFSA) e nacionalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005). A composição química dos aromatizantes é padronizada, porém, as doses de utilização recomendadas podem variar de uma marca para outra (ANVISA, 2007).

No entanto, apesar de sua importância para a indústria de alimentos, a utilização destes aditivos suscita uma série de dúvidas quanto a sua citotoxicidade, mutagenicidade, genotoxicidade e carcinogenicidade, visto que, até o momento, poucos são os trabalhos encontrados na literatura científica sobre a toxicidade, em nível celular, destes compostos (FENG et al., 2012). Corroborando com a citação de Feng et al. (2012), Honorato et al. (2013) declaram que do ponto de vista toxicológico os aromatizantes são a classe de aditivos alimentares menos estudados. Dessa forma, e de acordo com Rutkunas et al. (2010), os aromatizantes devem ser avaliados, urgentemente e continuamente, em vários organismos-teste, para assim se determinar com propriedade a real toxicidade destes aditivos.

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 *Allium cepa* (cebola) é tida como um eficiente organismo-teste vegetal para avaliação de toxicidade em nível celular (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008) em função de suas propriedades cinéticas de proliferação, por possuir cromossomos grandes e em

número reduzido ($2n=16$), o que facilita a análise na detecção de danos à estrutura da molécula de DNA, na observação de anomalias do fuso mitótico (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 em tecidos que estão em exposição a compostos químicos de interesse (TABREZ et al., 2011).

Ainda, este sistema-teste demonstra, em grande parte das vezes, similaridade satisfatória a resultados obtidos em outros bioensaios (ARUNG et al., 2011). Como exemplo pode-se citar os trabalhos realizados por Gomes et al. (2013) e Oliveira et al. (2013) que utilizaram as células meristemáticas de raízes de *A. cepa* para avaliar o potencial citotóxico dos principais corantes alimentares utilizados na indústria alimentícia e verificaram que os resultados obtidos foram semelhantes aos resultados de citotoxicidade observados em sistemas testes animais e em culturas de células.

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade em nível celular de dois aromatizantes alimentares, idênticos aos naturais, de sabores Queijo e Queijo Cheddar, na forma individual e associados, sobre o ciclo celular das células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. Estes dois aromatizantes foram escolhidos em função de serem amplamente utilizados, individualmente ou associados, em alimentos industrializados, como em pratos congelados e biscoitos salgados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

Segundo Veloso et.al. (2009) aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado aos alimentos intencionalmente, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais do alimento. De acordo com Aun et al. (2011), tão antigo quanto a espécie humana, estes compostos químicos sempre estiveram presentes na dieta, onde as antigas civilizações preservavam carnes e peixes no sal e usavam diversas ervas e temperos para melhorar ou realçar o sabor dos alimentos. Atualmente, qualquer alimento industrializado possui em sua constituição estes compostos.

Abrantes et al. (2007) relata que, sob o ponto de vista tecnológico, os aditivos alimentares são de grande importância para as indústrias de alimentos em função da produção em larga escala, tendo a função de conservar, colorir, aromatizar e garantir a uniformidade dos alimentos. De acordo com Salinas (2002), existem várias classes de aditivos, classificados de acordo com sua função, que são os conservantes (antioxidantes e antimicrobianos), acidulantes, emulsificantes, estabilizantes, espessantes, umectantes, anti-umectantes, corantes e aromatizantes. O Quadro 01 apresenta cada classe de aditivo alimentar e suas respectivas funções.

QUADRO 01 – Classes de Aditivos Alimentares.

Classe de aditivo	Função
Antiespumante	Previne ou reduz a formação de espumas.
Anti-umectante/ antiaglutinante	São capazes de reduzir características higroscópicas de alimentos e diminuir a tendência das partículas individuais a aderir umas às outras
Antioxidante	Retarda o aparecimento de alterações oxidativas do alimento.
Corante	Confere, intensifica ou restaura a cor do alimento.
Conservante	Impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microrganismos e enzimas.
Edulcorante	É diferente dos açúcares que dão sabor doce aos alimentos.
Espessante	Aumenta a viscosidade dos alimentos.
Gelificante	Da textura através da forma de gel.
Estabilizante	Manutenção da dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento.
Aromatizante/	Substâncias ou misturas com propriedades aromáticas, sápidas ou

Flavorizante	ambas, capazes de dar ou reforçar o aroma, ou ambos dos alimentos.
Umectante	Protege os alimentos de perda de umidade em ambiente de baixa umidade relativa ou que facilitam a dissolução de um pó em meio aquoso.
Regulador de Acidez	Altera ou controla a acidez ou alcalinidade dos alimentos.
Emulsionante/ emulsificante	Tornam possível a formação ou a manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento.
Melhoradores da Farinha	São substâncias adicionadas à farinha, que melhoram sua qualidade tecnológica.
Fermentos químicos	São substâncias ou misturas de substâncias que liberam gás e desta maneira, aumenta o volume da massa.

Fonte: Salinas, 2002.

Os aromatizantes alimentares são um dos principais aditivos utilizados na indústria alimentícia por sua capacidade aromatizante, baixo custo e tempo de permanência nos alimentos. São classificados em dois grandes grupos: as essências naturais e as essências artificiais (TONETTO et al., 2008).

A essência natural, óleo essencial ou óleo etéreo, é o produto aromático, sávido, volátil e oleoso, extraído de vegetais, enquanto que o extrato vegetal aromático é um produto aromático e agradável ao paladar, obtido de plantas. Essência artificial é constituída por substâncias artificiais aromáticas, contendo ou não substâncias extraídas de vegetais. No caso das essências artificiais ou dos aromatizantes sintéticos é de suma importância a inserção no rótulo do produto a declaração "Aromatizado artificialmente", porém não é obrigatória a informação sobre qual a substância química utilizada (LIMA, 2011). Esta classe de aditivos apresenta o maior número de compostos químicos, uma vez que os aromas são muito complexos. Alguns produtos podem apresentar naturalmente mais de mil substâncias que, em conjunto, conferem um aroma característico (CARVALHO et al., 2005).

Apesar de sua importância, o emprego de aromatizantes na produção de alimentos resulta da controvérsia entre a necessidade e a segurança de seu uso. Embora sob o ponto de vista tecnológico haja benefícios com a utilização destes, existe a preocupação constante quanto aos riscos toxicológicos potenciais decorrentes da ingestão diária dessas substâncias químicas (AUN et al., 2011). É sabido que os aditivos alimentares, de maneira geral, antes de serem liberados para consumo, são avaliados individualmente quanto a sua necessidade

tecnológica e segurança. Sua aprovação e incorporação à legislação específica de alimentos poderão ocorrer com restrição de uso, ou seja, serão estabelecidos limites máximos ou de tolerância (CHEESEMAN et al., 2012). Em âmbito mundial, o controle para a utilização de aditivos alimentares baseia-se na Ingestão Diária Aceitável (IDA) que tem como base os resultados de pesquisas internacionais e as recomendações do Codex Committee on Food Additives and Contaminants (CCFAC) (BESSONOV et al., 2011; GANESSAN et al., 2011).

Em relação aos aromatizantes, a sua utilização em alimentos ainda suscita uma série de dúvidas quanto a sua citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade, visto que, na literatura, existe uma escassez de trabalhos avaliando a toxicidade, em nível celular, destes compostos (FENG et al., 2012). Reafirmando a citação de Feng et al. (2012), Honorato et al. (2013) declaram que do ponto de vista toxicológico, tanto em nível sistêmico como em nível celular, os aromatizantes alimentares são os menos estudados dentre os aditivos. Assim, conforme relata Rutkunas et al. (2010), a ação destes aditivos em nível celular deve ser avaliada em vários organismos de teste, como em mamíferos, plantas, insetos e em culturas de células *in vitro*, de modo a medir com precisão a toxicidade real desses compostos químicos.

Os bioensaios com plantas *Allium cepa* são considerados bastante sensível e simples no acompanhamento da citotóxica e efeitos dos compostos químicos (USEPA) (IGANCI et al., 2006), foi indicado como um organismo vegetal teste eficiente para avaliação da citotoxicidade (FISKESJÖ, 1994). Devido entre outras características, as suas propriedades cinéticas e de proliferação, por possuir grandes cromossomos e em reduzido número ($2n = 16$) estas características facilita a análise na verificação das alterações do índice de divisão celular, como no aumento ou redução da proliferação de células do meristema e tecidos expostos aos compostos químicos de interesse (TABREZ et al., 2011), e demonstra satisfatória similaridade aos resultados obtidos com outros bioensaios, tais como os realizados com animais e em culturas de células (ARUNG et al., 2011).

Cabera et. al, (1999) afirma que o método de avaliação de alterações cromossômicas em raízes de *A. cepa* é validado pelo Programa Internacional de Segurança Química (IPCS, OMS) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP) como um eficiente teste para análise e monitoramento da genotoxicidade de substâncias ambientais. Ma et al. (1995) relatam que esses sistemas também têm importância no monitoramento da poluição ambiental e avaliação do potencial mutagênico de muitos compostos químicos. De acordo com Fiskesjo (1994), a importância e a utilidade de sistemas testes vegetais na avaliação de riscos de genotoxicidade, enfatiza que apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e

animais, há também similaridades, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos.

Os resultados de teste de toxicidade utilizando a espécie *A. cepa* ressalva a importância deste sistema teste, pois o mesmo apresenta resultados semelhantes aos obtidos em outros ensaios. Pode-se mencionar Oliveira et. al. (2013) e Gomes et. al. (2013), nos quais os resultados obtidos através destes sistemas-teste são excelentes parâmetros de análise citotóxica. Com isso comprovasse a importância desse sistema teste para análise citotóxica de aromatizantes artificiais.

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 de 2014 a Julho de 2014.

3.1 Obtenção dos aromatizantes alimentares e definição das doses de estudo

Os aromatizantes alimentares sintéticos salgados e líquidos, de sabores Queijo e Queijo Cheddar, foram obtidos de uma revendedora especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos localizada na região nordeste do Brasil. Os aromatizantes, de aspecto oleoso, estavam acondicionados em frasco âmbar com capacidade para 100ml, e estavam dentro do prazo de validade. No rótulo dos produtos sugeria-se 1 ml de aromatizante para 300g de massa. Cada bulbo de cebola utilizado pesou em média 300g. Assim, as doses estabelecidas neste trabalho foram de 1,0 e 2,0 ml.

Dessa forma, inicialmente foram avaliadas para cada aromatizante, de forma individual, as doses de 1,0 e 2,0 ml. Em seguida avaliou-se os aromatizantes em associação, da seguinte forma: 0,5 ml do aromatizante sabor Queijo associado a 0,5 ml do aromatizante Queijo Cheddar; 1,0 ml do aromatizante sabor Queijo associado a 1,0 ml do aromatizante sabor Queijo Cheddar.

É importante explicar que para avaliação de citotoxicidade e mutagenicidade dos aromatizantes em questão, de forma individual e associada, nenhuma diluição foi realizada para a definição das doses, ou seja, teve-se o intuito de verificar a toxicidade dos aromatizantes sob as raízes de *A. cepa* L direto na solução presentes nos frascos dos produtos. Optou-se por fazer desta forma em função do receio, já que cada aromatizante possui uma formulação complexa constituída por muitos compostos químicos, de que alguns componentes presentes nos aromatizantes fossem alterados. Também é importante relatar que a formulação de qualquer aromatizante alimentar, natural ou sintético, é padronizada mundialmente, não havendo mudanças na formulação química em diferentes marcas destes produtos.

3.2 Obtenção de células meristemática para a análise citogenética

Os bulbos de *Allium cepa* foram colocados para enraizar em frascos com água destilada, à temperatura de 25°C e aerados constantemente, até a obtenção de raízes com cerca de 1,0cm

de comprimento. Para análise de cada dose e para as doses associadas foi estipulado um grupo experimental com cinco bulbos de cebolas.

Antes de se colocar as raízes em contato com as suas respectivas doses, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle (CO) do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em seus respectivos tratamentos e doses associadas, por 24 horas, procedimento este denominado de tempo de exposição 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 doses onde permanecera por mais 24 horas, o que se denomina de tempo de exposição 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 das doses estudadas em mais de um ciclo celular. A fixação das raízes foi feita em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), a temperatura ambiente, por 24 horas. Para cada coleta de raiz, foram retiradas, em média, três raízes por bulbo de cebola.

3.3 Preparo e leitura das lâminas, e análise dos dados

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra & 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 interfase, 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 a ação das doses 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 (χ^2), com nível de probabilidade <0.05 , por meio do software estatístico BioEstat 3.0 (2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1, é apresentado o número de células em interfase e em diferentes fases da divisão celular e os valores de índice mitóticos obtidos a partir de células de tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com água e com aromatizante alimentar sabor Queijo, nas doses de 1,0 e 2,0 ml, nos TE 24 e 48 horas. Na descrição dos resultados também foram mostrados os valores significativos de χ^2 .

TABELA 01 - Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa* tratadas com 1,0 e 2,0 ml do aromatizante alimentar sabor Queijo nos TE 24 e 48 horas

Aromatizante	TE	Células					Células em Divisão	IM (%)
		Indiferenciadas/ Intérfase	P	M	A	T		
Queijo 1ml	CO	3.888	856	115	93	48	1112	22,2 ^a
	24h	4.425	498	21	30	26	575	11,5 ^b
	48h	4.470	477	23	18	12	530	11,7 ^b
Queijo 2ml	CO	4.208	595	90	66	41	792	15,8 ^a
	24h	4.713	173	69	26	19	287	5,7 ^b
	48h	4.667	177	72	59	25	333	6,7 ^b

TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; IM – Índice Mitótico; Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste χ^2 .

A partir dos resultados demonstrados na Tabela 01, observou-se que os dois aromatizantes, nas duas doses avaliadas, reduziram de forma estatisticamente significativa o índice de divisão celular das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* quando comparado com o IM obtidos para os seus respectivos controles. Quando confrontado os IM dos TE da mesma dose entre si verificou-se que valores obtidos foram considerados estatisticamente iguais. As duas doses estudadas dos dois aromatizantes associados não promoveram anomalias de fuso mitótico e nem aberrações cromossômicas ao sistema teste utilizadas. Dessa forma, este aromatizante, nas condições analisadas mostrou-se citotóxico ao sistema teste utilizado.

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram aos de estudos feitos na década de 80, utilizando-se sistema teste animal e cultura de células normais, onde verificou-se que o aromatizante de sabor Queijo foi citotóxico e mutagênico aos sistemas testes utilizados. Desde a década de 90 não foram encontradas outras pesquisas avaliando a toxicidade em nível celular, e nem em nível sistêmico, do aditivo alimentar em questão.

Na Tabela 2, é apresentado o número de células em interfase e em diferentes fases da divisão celular e os valores de índice mitóticos obtidos a partir de células de tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com água e com aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar, nas doses de 1,0 e 2,0 ml, nos TE 24 e 48 horas. Na descrição dos resultados também foram mostrados os valores significativos de χ^2 .

TABELA 02 - Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa* tratadas com 1,0 e 2,0 ml do aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar nos TE 24 e 48 horas

Aromatizante	TE	Células Indiferenciadas/ Intérfase	P	M	A	T	Células em Divisão	IM (%)
	CO	3541	1205	116	85	53	1459	29,2 ^a
Queijo Cheddar 1ml	24h	4249	544	107	44	56	751	15,0 ^b
	48h	4702	114	106	43	35	298	6,0 ^b
	CO	3426	465	55	32	22	574	11,4 ^a
Queijo Cheddar 2ml	24h	4777	213	57	31	22	323	6,5 ^b
	48h	4685	282	18	07	08	315	6,3 ^b

TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; IM – Índice Mitótico; Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste χ^2 .

A partir dos resultados descritos na Tabela 02, é possível observar que a as duas doses avaliadas do aromatizante sabor Queijo Cheddar, nos dois TE, reduziram o IM das células de raízes de *A. cepa* quando confrontados com os dados de IM obtidos para os seus respectivos controles. Ainda é possível observar que na dose de 1,0 ml os índices de divisão celular para o TE 24h foi estatisticamente maior que o IM obtidos para o TE 48 h. Já para a dose de 2ml deste aromatizante, quando confrontados os IM obtidos para os TE 24 e 48h observou-se que não há diferença significativa. Dessa forma, os resultados obtidos neste trabalho, nas condições analisadas, mostra que o aromatizante em questão teve grande efeito antiproliferativo as células de *A. cepa*.

Não foram observadas alterações de fuso mitótico e nem cromossômicas em nenhuma das doses avaliadas para o aromatizante em questão. Infelizmente, não foram encontrados na literatura científica trabalhos sobre a toxicidade em nível e sistêmica sobre este aromatizante. Assim, pelos resultados obtidos aqui para o aromatizante Queijo Cheddar é de grande importancia que outros estudos sejam conduzidos, principalmente em sistema-teste animal para se somar a este e assim avaliar com propriedade a toxicidade em nível celular deste aditivo alimentar.

Na Tabela 3, é apresentado o número de células em interfase e em diferentes fases da divisão celular e os valores de índice mitóticos obtidos a partir de células de tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com água, e com os aromatizantes alimentares Queijo e Queijo Cheddar, nas doses de 0,5ml de aromatizante sabor Queijo associado a 0,5ml de aromatizante sabor Queijo Cheddar; e 1,0ml de aromatizante sabor Queijo associado a 1,0 ml de aromatizante sabor Queijo Cheddar. Na descrição dos resultados também foram mostrados os valores significativos de χ^2 .

TABELA 03 - Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa* tratadas com 0,5ml de aromatizante sabor Queijo associada a 0,5ml de aromatizante sabor Queijo Cheddar; e 1,0ml de aromatizante sabor Queijo associado a 1,0ml do aromatizante sabor Queijo Cheddar, nos TE 24 e 48 horas

Queijo + Queijo Cheddar	TE	Células					Células em Divisão	IM (%)
		Indiferenciadas/ Intérfase	P	M	A	T		
0,5ml + 0,5ml	CO	3914	851	101	86	48	1086	21,7 ^a
	24h	4786	162	22	14	16	214	4,3 ^b
	48h	4944	23	19	07	07	56	1,1 ^c
1,0ml + 1,0ml	CO	3272	642	42	20	24	728	14,5 ^a
	24h	4476	469	24	16	15	524	10,5 ^b
	48h	4731	225	24	10	10	269	5,4 ^c

TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; IM – Índice Mitótico; Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste χ^2 .

A partir dos resultados apresentados na Tabela 03, é possível verificar que tanto nas células tratadas com 0,5ml de aromatizante sabor Queijo associado a 0,5ml do aromatizante sabor Queijo Cheddar quanto nas células sob o tratamento com 1,0ml de aromatizante sabor Queijo associado a 1,0ml de aromatizante sabor Queijo Cheddar, nos TE de 24 e 48h, houve uma redução drástica do índice de divisão celular em relação aos IM obtidos para as células tratadas somente com água.

Também se pode observar que o IM obtidos para TE 48h das duas doses de associação estudadas foram significativamente menores aos obtidos para os seus respectivos TE 24h. Assim as doses associadas dos dois aromatizantes foram altamente citotóxicas ao sistema teste em questão. Da mesma forma que os resultados obtidos para os aromatizantes testados individualmente, as doses associadas não induziram alterações de fuso mitótico e nem aberrações cromossômicas.

Segundo Cheeseman (2012), os aromatizantes são considerados um avanço polêmico da indústria de alimentos por muitos especialistas da área de saúde que alegam que os

mesmos juntamente com os corantes alimentares contribuem de forma significativa para o empobrecimento da dieta e para o desencadeamento e potencialização de patologias, principalmente em crianças (CHEESEMAN, 2012). Validando a citação de Cheeseman (2012), a ANVISA relata que doses elevadas de aromatizantes alimentares podem provocar ações irritantes e narcóticas ao organismo (BRASIL, 2007). Também podem produzir toxicidade crônica ao trato digestório a longo prazo, sempre que utilizados de maneira indiscriminada. No entanto, este órgão regulamentador não informa quais são os limites de ingestão diária ideais para estes aditivos e quais doses são consideradas elevadas ao organismo.

Ainda, Pesquisadores afirmam que os aromatizantes alimentares podem ser bastante tóxicos quando utilizados por tempo prolongado, promovendo hiperatividade em crianças com e sem déficit de atenção (STEVENS et al., 2013), diminuição significativa na concentração de hemoglobina no sangue, alterações drástica no funcionamento do fígado e diminuição significativa no peso de camundongos (HANAN; MONAN, 2013), alergias, hipersensibilidade cutânea e indigestão em humanos (ANDERSON et al., 2013). Porém, poucos são os trabalhos encontrados na literatura avaliando a toxicidade, em nível celular e sistêmico, dos aromatizantes alimentares.

Assim pelos resultados obtidos aqui com os aromatizantes de sabor Queijo e sabor Queijo Cheddar, pela escassez de trabalhos avaliando a toxicidade em nível celular dos mesmos, e pela escassez de trabalhos avaliando a toxicidade dos aromatizantes alimentares em geral, torna-se de extrema necessidade que outros trabalhos avaliando a toxicidade sejam realizados, em diferentes sistemas teste. Condição esta que corrobora a própria citação da ANVISA, de que deve ser constante o aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando à proteção da saúde da população, além da necessidade de segurança de uso de aditivos alimentares na fabricação de alimentos (BRASIL, 2007).

5 CONCLUSÃO

Os dois corantes, nas condições analisadas, foram citotóxicos ao sistema teste em questão. Assim, verifica-se que, embora a utilização destes aditivos, em doses adequadas, seja permitida pelo Ministério da Saúde, entretanto, torna-se necessário que sejam feitos mais ensaios com o objetivo de determinar com maior propriedade seus efeitos nocivos.

REFERÊNCIAS

ABRANTES, S.; AMORIM, J. R.; OLIVEIRA, S. M.; BASTOS, P. A.; NERY, V. V. C.; BAZILIO, F. S. Avaliação de corantes artificiais em bebidas não alcoólicas e não gaseificadas. **Revista Analytica**, Rio de Janeiro, n. 27. p. 30-33, fev./mar. 2007.

ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Ver. Nutr.**, Campinas, v. 2, n. 13, p. 81-88, 2000.

AYRES, M.; AYRES J. R. M.; AYRES D. L.; SANTOS, A. S. **BioEstat 5.0-Aplicações Estatísticas nas Áreas das Ciências Biológicas e Médicas**: Sociedade Civil Mamirauá, Belém. Brasília, CNPq, 2007. 290 p.

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, n. 5/6, p. 209-214, 2011.

AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALIL, J.; AGONDI, R. C.; MOTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Rev Bras Alerg Imunopatol** v. 34, n.5: p. 177-186, 2011.

BRASIL, Agência Nacional da Vigilância Sanitária. **Resolução nº 104, de 14 de maio**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/104_99.htm, 1999

BRASIL, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 217, de 29 de Julho de 2005**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2005/rdc/21705rdc.pdf>>. Acesso em: 08 fev, 2014.

BRASIL, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 05, de 15 de Janeiro de 2007**. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf>. Acesso em: 08 fev, 2014.

CABRERA GL, Rodriguez DMG 1999. **Genotoxicity of soil from farmland irrigated with wastewater using three plant bioassays**. *Mutat Res* 426: 211-214.

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**. England. v.72, p.722-725, 2008.

COSTANT, P. B. L.; STRINGUETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **B. CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2007.

CARVALHO, Paulo Roberto de. Aditivos dos Alimentos. Faculdade de filosofia Ciências e

Letras de São José do Rio Pardo. Revista Logos, n. 12 São José do Rio Pardo: 2005.

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

FENG, J.; CERNIGLIA, C. E.; CHEN, H. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. **Frontiers in Bioscience (Elite Edition)**, v. 1, n. 4, p. 568-86, 2012.

Fiskesjo G 1994. The Allium Test II: **Assesmente of chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of Allium cepa L.** Environ Toxicol Water Qual 9: 234-241.

GOMES, K. M, et al. "Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatzazine yellow (E-102) on Allium cepa L. root meristematic cells." **Food Science and Technology (Campinas)** 33.1 (2013): 218-223.

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

Hannan R. D; Luyken J; Rothblum L. I. **Regulation of ribosomal DNA transcription during contraction-induced hypertrophy of neonatal cardiomyocytes.** J. Biol. Chem. 271:3213–3220.

HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde (Mossoró – RN - BRASIL)**, v. 8, n. 5, p. 01 - 11,(Edição Especial) dezembro, 2013

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.

MA, T. H.; XU, Z.; Xu, C.; MCCONNELL, H.; RABAGO, E. V.; ARREOLA, G.A.; ZHANG, H. 1995. **The improved Allium/Vicia root tip micronucleus assay for clastogenicity of environmental pollutants.** Mutat Res 334: 185-195.

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.

MELLO, C.; THOMÉ, F.; LIMA, M. **Aromatizantes. Instituto de Ciência e Tecnologia de Alimentos.** Rio Grande do Sul: Universidade Federal do Rio Grande do Sul; 2004.

OLIVEIRA. et al. **Cytotoxicity of erythrosine (E-127), brilliant blue (E-133) and red 40 (E-129) food dyes in a plant test system-doi: 10.4025/actascibiolsci. v35i4. 18419.** *Acta Scientiarum. Biological Sciences*35.4 (2013): 557-562.

PORTO, Caroline; SALIS, Roberto; OLIVAREZ, Silvana. **AROMATIZANTES EM ALIMENTOS.** 2004.

RUTKUNAS, V.; SABALIAUSKAS, V.; MIZUTANI, H. Effects of different food colorants and polishing techniques on color stability of provisional prosthetic material. **Dental Materials Journal**, v.29, n.2, p.167-176, 2010.

SALINAS, R.D. **Alimentos e Nutrição: Introdução à Bromatologia**. 3ªEd. Porto Alegre: Artmed, 2002.

STEVENS L.J. et. al. **Amounts of Artificial Food Dyes and Added Sugars In Food and Sweets Commonly Consumed**, 2014

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, n. 3, p.250-75, 2011.

VELOSO, L. A. Corantes e Pigmentos - Dossiê Técnico. **Serviço Brasileiro de Respostas Técnicas**. Instituto de Tecnologia do Paraná, 2012.