



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

GARDENIA RODRIGUES FERREIRA

**CITOTOXICIDADE DE AROMATIZANTE ALIMENTAR SINTÉTICO DE SABOR  
CEBOLA EM SISTEMA TESTE *in vivo***

PICOS, PIAUÍ

2014

GARDENIA RODRIGUES FERREIRA

**CITOTOXICIDADE DE AROMATIZANTE ALIMENTAR SINTÉTICO DE SABOR  
CEBOLA 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<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Ana Paula Peron.

PICOS, PIAUÍ

2014

Eu, **Gardenia Rodrigues Ferreira**, 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, 12 de agosto de 2014.

  
Assinatura

#### FICHA CATALOGRÁFICA

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

**F383c** Ferreira, Gardenia Rodrigues.  
Citotoxicidade de aromatizante alimentar sintético de sabor cebola em sistema teste in vivo / Gardenia Rodrigues Ferreira. – 2014.  
CD-ROM : il; 4 ¼ pol. (28 p.)

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

1. Aditivo Alimentar. 2. Divisão Celular. 3. Aberrações Celulares.  
4. Sistema Teste-Vegetal I. Título.

**CDD 581.87**

**CITOTOXICIDADE DE AROMATIZANTE ALIMENTAR SINTÉTICO DE SABOR  
CEBOLA EM SISTEMA TESTE *in vivo***

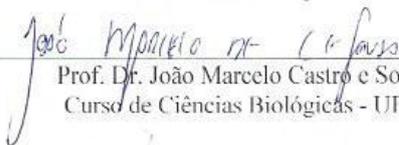
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí,  
Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do grau  
de Licenciado em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 30/07/2024

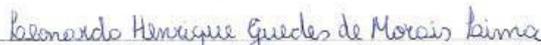
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Dr. João Marcelo Castro e Sousa  
Curso de Ciências Biológicas - UFPI



Prof. Me. Leonardo Henrique Guedes de Morais Lima  
Curso de Ciências Biológicas – UFPI

A Deus dedico a minha maior gratidão por me guiar com a luz do seu infinito amor e ao meu Pai ofereço este mérito por ser um Homem guerreiro que sempre luta para que eu proporcione as mais singelas VITÓRIAS.

DEDICO

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente ao meu Deus todo poderoso por sempre me guiar com todo o seu amor incondicional, por me fazer forte nas lutas e em todos os obstáculos encontrados pois nada é impossível quando a força de vencer é maior, suas bênçãos são essenciais na minha vida, tu és o “MEU REFUGIO E FORTALEZA”.

Ao meu Pai, que foi essencial para eu alcançar esta vitória, pois nunca poupou seus esforços a meu favor, sempre do meu lado sem me deixar faltar o que sempre está ao seu alcance, por me fazer forte a vencer todos os obstáculos possíveis e torcer por minha felicidade de ver um dia meus sonhos se concretizar pois até se ausenta dos seus pra erguer os meus...Você é meu Primordial em tudo e sempre será meu GUERREIRO!

A minha mãe pelo cuidado e aos meus irmãos pelo companheirismo e apoio em todos os momentos.

A minha madrinha que cumpre com seu o papel de segunda mãe por sempre me apoiar e se preocupar com os momentos difíceis, pois sua importância veio desde o início da largada que foi passar no vestibular e nunca se ausentou durante o percurso pois sempre esteve e estará disposta a me ajudar e sei que contigo posso contar sempre.

A minha orientadora Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Ana Paula Peron, por ter me acolhido com tanto afeto a meu convite proposto a orientação do meu Trabalho de conclusão de curso, por ter me passado segurança quando me propôs o tema e me incentivar que eu era sim capaz de desenvolvê-lo, por sua dedicação, paciência, ensinamentos repassados, disposição em me orientar, sugestões e ajudas, por sempre me atender com respeito e educação e por fazer com que no final tudo desse certo e então está aqui defendendo o meu trabalho, enfim não tenho palavras para lhe agradecer.

A minha colega de turma Layanna que sempre esteve do meu lado em todos os momentos, sempre disposta a me ajudar a vencer os obstáculos, por poder ter sempre contado contigo, pois foi a todo tempo meu braço direito (jamais esquecerei...), E a Nagylla e Samara pelo companheirismo durante todo a nossa graduação.

**MEU MUITO OBRIGADO A TODOS VOCES!!!**

Você não sabe o quanto eu caminhei, pra chegar até aqui. Percorri milhas e milhas antes de dormir, eu nem cochilei. Os mais belos montes escalei, nas noites escuras de frio chorei, ei, ei, ei...

*(Da Gama / Toni Garrido)*

## RESUMO

Os aromatizantes se tornaram obrigatórios na alimentação moderna por sua capacidade em manter o sabor e o aroma dos alimentos. No entanto, esta classe de aditivos alimentares é a menos estudada do ponto de vista toxicológico. Conforme relatado na literatura científica, as células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. são um eficiente sistema teste para a avaliação de toxicidade de compostos químicos. Assim, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade do aromatizante alimentar sintético, idêntico ao natural, sabor Cebola, muito utilizado em pratos prontos congelados, biscoitos e petiscos, nas doses de: 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0ml, e nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, em células de pontas de raízes de cebola. Para avaliação de cada dose utilizou-se um grupo de cinco bulbos de cebolas, que primeiramente foram enraizados em água destilada, e em seguida transferidos para as suas respectivas soluções. 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 todas as doses avaliadas diminuíram estaticamente o índice de divisão celular das células do sistema teste em questão, nos dois tempos de exposição avaliados. Estas doses também ocasionaram, de forma significativa, aberrações celulares e anomalias de fuso mitótico as células do bioensaio utilizado. Portanto, nas condições analisadas, o aromatizante alimentar sabor Cebola foi citotóxico e mutagênico.

**PALAVRAS-CHAVES:** Aditivo alimentar, Divisão celular, Aberrações celulares, Sistema-teste vegetal.

## ABSTRACT

Flavorings became mandatory in the modern feeding for its ability to maintain the flavor and aroma of foods. However, this class of food additives is the least studied toxicologically. As reported in the scientific literature, the meristem cells of *Allium cepa* L root are an efficient test for evaluation of toxicity of chemical compounds. This study aimed to evaluate the toxicity of synthetic food flavoring, natural identical, onion flavor, widely used in frozen ready meals, biscuits and snacks, at doses of: 1.0; 2.0; 3.0 and 4.0 ml, and the exposure times of 24 and 48 hours, in cells of root tips of onion. For each dose evaluation used a group of five bulbs of onions, which were first embedded in distilled water and then transferred to their respective solutions. The root tips were collected and fixed in acetic acid (3:1) for 24 hours. The slides were prepared by crushing and stained with 2% acetic orcein. Cells were analyzed throughout the cell cycle, totaling 5,000 for each control and exposure time. The calculated mitotic index and cellular aberrations were subjected to statistical analysis using the chi-square test ( $p < 0.05$ ). From the results it was observed that all tested doses decreased the rate of cell division of cells of the test system in question, in the two evaluated exposure times. These doses also resulted, in a significant way, cellular aberrations and anomalies spindle cells used in the bioassay. Therefore, under the conditions studied, the onion flavor flavoring food was cytotoxic and mutagenic. Other studies, especially those using animal bioassays, must be conducted to evaluate carefully the toxicological action, at the cellular level, of this food additive. It is important to mention that this was the first study performed to evaluate the toxicity of the onion flavor flavoring at the cellular level

**KEYWORDS:** Food additive, cell division, cellular aberrations, system test plant.

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 01** – Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa* tratadas com 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL do aromatizante alimentar sabor Cebola nos TE 24 e 48 horas.....  
19

**Tabela 02** – Número de pontes anafásicas e telofásicas, células micronucleadas, metáfases colchícinicas, ampliações e total de aberrações celulares encontradas em cada controle e nas doses de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL de aromatizante alimentar sabor Cebola nos TE 24 e 48 horas.....20

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>11</b>
<b>2 REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>13</b>
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>17</b>
3.1 Obtenção dos aromatizantes alimentares e definição das concentrações.....	17
3.2 Obtenção de células meristemática para a análise citogenética.....	17
3.3 Preparo e leitura das lâminas, e análise dos dados.....	18
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>19</b>
<b>5 CONCLUSÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>24</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os aromatizantes são aditivos alimentares com propriedades aromáticas e/ou sápicas, capazes de conferir ou reforçar o aroma e o sabor dos alimentos sem o propósito de nutrir (CONSTANT et al., 2007). São identificados na indústria alimentícia pela letra F e classificados como natural, sintético idêntico ao natural, sintético artificial, de reação ou transformação, e de fumaça (MAGALI, 2006).

Na formulação de qualquer destes aditivos estão presentes diluentes, antioxidantes, antiespumantes, conservantes, emulsificantes, estabilizantes, reguladores de acidez, realçadores de sabor, antieméticos, antiaglutinantes, corantes, e solventes de extração e processamento, aprovados para uso em âmbito mundial pela European Food Safety Authority (EFSA), e nacionalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005). Em função de sua formulação química, os aromatizantes, em geral, 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 (CHEESEMAN, 2012).

Assim, pesquisadores brasileiros, como Tonetto et al. (2008), relatam que a utilização de aromatizantes, principalmente os sintéticos, suscita uma série de dúvidas quanto a sua toxicidade em nível sistêmico e celular, e declaram ser urgente a realização de trabalhos, em sistemas testes diferentes, que avaliem o potencial tóxico dos aromatizantes alimentares.

Os bioensaios com plantas têm sido considerados bastantes sensíveis e simples no monitoramento dos efeitos citotóxicos de compostos químicos pela United States Environmental Protection Agency (USEPA) (IGANCI et al., 2006) e a *Allium cepa* (cebola) tem sido indicada como um eficiente organismo teste para a 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 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).

Ainda, este sistema teste demonstra, em grande parte das vezes, similaridade satisfatória a resultados obtidos com 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 usaram 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 destes estudos 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 do aromatizante alimentar sintético salgado, idêntico ao natural, de sabor Cebola, amplamente utilizado na indústria de alimentos em pratos prontos congelados, biscoitos salgados, petiscos e pães, em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

## 2 REFERENCIAL TEÓRICO

Antigamente, os alimentos eram fabricados e produzidos na mesma região ou regiões próximas àquelas de comercialização. Nos dias de hoje, com a globalização e o desenvolvimento da logística em nível nacional e internacional, grande parte dos alimentos provenientes de regiões longínquas necessita de aditivos alimentares e conservantes para sua maior durabilidade (AISSA, 2010). No entanto, os aditivos alimentares têm como finalidade melhorar os alimentos industrializados dando-os cor, aroma e textura tornando-os mais aceitáveis pelo consumidor e proporcionar maior durabilidade ao mesmos (CARVALHO, 2005).

Os aromatizantes alimentares são de grande importância para a indústria alimentícia por sua capacidade aromática, baixo custo e tempo de permanência nos alimentos (TONETTO et al., 2008). Conferem propriedades sensoriais que caracterizam cada sabor e aroma dos mais diversos produtos. A maior parte do sabor de um alimento é diretamente influenciada pelo seu aroma e em meio a uma grande variedade de opções e novos alimentos surgindo no mercado, são as características diferenciais que vão determinar a aceitação do produto pelo consumidor (MELLO et al., 2004). São geralmente agrupados como *saborizantes* ("flavorizantes"), compreendendo dois grandes grupos: os essências naturais e os essências artificiais (LIMA, 2011).

O aroma natural é aquele cuja elaboração utilizou-se exclusivamente de matéria prima quimicamente definida ou também produto aromatizante natural, extraído a partir de matérias vegetais ou de animais, seja por extração (processos físicos) ou por processos biotecnológicos (enzimáticos ou microbiológicos). No primeiro caso, a extração é feita a partir de matérias primas tradicionais; no segundo caso, o desenvolvimento recente dos processos biotecnológicos permite facilitar certas limitações (LUERCE, 2008).

Já os aromas artificiais, extraído por meio de síntese, são muito mais utilizados nos alimentos pelo seu alto poder aromatizante, baixo custo e persistência do aroma. Não há perigo de toxicidade nos aromatizantes naturais, já nos artificiais, quando aplicados em doses baixa, não há risco. Quando as doses são elevadas, podem provocar ações irritantes e narcóticas, outros podem causar toxicidade crônica em longo prazo, sempre que sejam administrados em doses superiores às recomendações (SALINAS, 2002).

Como descrito por Valsechi (2001) o aroma utilizado deve aparecer no rótulo por extenso, como por exemplo: Aroma Natural de Café, Aroma Artificial de Morango, Aroma Natural Reforçado de Queijo Tipo Parmesão, etc. Nesta classe de aditivos é onde existem o

maior número de substâncias, uma vez que os aromas mostram-se muito complexos. Alguns produtos podem apresentar naturalmente mais de mil substâncias com o objetivo de conferir apenas único aroma característico. Como exemplo pode-se citar o Aroma Natural de Café, onde o café torrado apresenta um aroma tão complexo que já se identificaram mais de mil componentes na sua constituição.

Assim, por sua formulação química complexa os aromatizantes são considerados um avanço polêmico da indústria de alimentos por muitos especialistas da área de saúde que alegam que estes 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, levantando uma série de dúvidas quanto a sua toxicidade em nível sistêmico e celular (SILVA; NEED, 2010; CHEESEMAN, 2012). Entretanto, o uso destes compostos químicos é um tema que preocupa consumidores e os profissionais da área da saúde quanto a sua inocuidade (VARELA; FISZMAN, 2013).

Na literatura, há informações a respeito de alguns aditivos que podem causar sérios problemas de saúde como câncer, desenvolvimento de alergias e hiperatividade em criança (ANVISA, 2009). Dentre os aditivos, os aromatizantes são os que possuem poucos relatos sobre a sua inocuidade na literatura. Por exemplo, o glutamato monossódico, foi o primeiro aromatizante a ser vendido comercialmente que vem sendo utilizado há séculos para proporcionar o sabor característico aos pratos orientais. Durante muito tempo foi associado à Síndrome do Restaurante Chinês, que se caracteriza por eritema facial, sudorese, opressão torácica e eventualmente náuseas e broncoespasmo. Alguns pacientes apresentaram sintomas subjetivos após a ingestão de altas doses, em torno de três gramas. Suspeita-se que o glutamato monossódico seja um fator desencadeante de asma, porém os estudos são controversos e este mecanismo permanece indefinido (BURGE, 1979; FDA, 1995). A baunilha e o bálsamo do Peru são aromatizantes que podem provocar dermatite de contato ou agravar a dermatite atópica (WILSON; BAHNA, 2005)

Cita-se também as substâncias aromáticas Lodyne P208E ® e o Diacetil (2,3 butanedione) encontrados em pipoca de micro-ondas um líquido amarelado que normalmente é misturado com outros ingredientes para produzir o sabor de manteiga ou de outros sabores. Foram avaliados ambos os compostos de mutagenicidade com células de mamíferos do ensaio da mutação genética em células de linfoma de ratos. Lodyne P208E ® foi menos tóxico e não induziu uma resposta mutagênica. Diacetil induziu uma resposta altamente mutagênica no ensaio de mutação L5178Y do linfoma do rato (WHITTAKER et al., 2008). Outro aromatizante encontrado foi o óleo de Sassafrás, obtido do arraste a vapor do tronco e lenho

de uma espécie de Laurácea a *Ocotea pretiosa* (Nees)Mez (RIZZINI, 1983). Já foi usado como aromatizante em bebidas não alcoólicas devido a seu aroma característico, porém o seu uso para este fim está proibido devido a sua toxicidade. Estudos realizados com ratos mantidos sob dieta alimentar contendo safrol principal componente do óleo de sassafrás evidenciaram efeitos hepatotóxicos e cancerígenos. O óleo de Sassafrás ainda é utilizado como aromatizante de produtos técnicos, como inseticidas e desinfetantes (COSTA,2000).

Outros aditivos relatados na literatura, por exemplo o aspartame, aditivo pertencente aos edulcorantes e que confere sabor doce aos alimentos diferentes dos açúcares utilizado em diversos alimentos (ANVISA, 2006). Apresentou efeitos mutagênicos em diferentes sistemas experimentais (SHEPHARD et al.,1993). Da classe dos conservantes alimentares que apresentam efeitos mutagênicos e/ou genotóxicos, tem-se por exemplo, o benzoato de sódio (BS) muito utilizado em presunto, molhos de saladas, sucos e conservas. Tem sido relatado que o BS aumenta o número basal de aberrações cromossômicas, diminuindo a taxa de mitoses (índice mitótico – I.M.) em teste de *Allium cepa* (NJAGIE & GOPALAN, 1982; DÕNBAK et al., 2003). O citrato de potássio (CP) utilizado em sopas de bebê, biscoitos e produtos fermentados e o citrato de sódio (CS) usado como aromatizante e conservante em presuntos e leite em pó são também responsáveis por indução de lesões no DNA (WHO, 1974; NAIR, 2001).

Ainda sobre os aditivos tóxicos o corante eritrosina, segundo Spellmeier e Stulp (2009) este aditivo provoca reações alérgicas nos olhos e na pele, dores de cabeça e náuseas. É um corante muito utilizado em bebidas, biscoitos, doces, produtos de panificação, produtos cárneos, gomas de mascar e sorvetes (MITTAL et al., 2006). Já o corante alimentar Azul Brilhante muito utilizado em produtos lácteos, doces, em produtos farmacêuticos e cosméticos (BESSONOV et al. 2011). Pode provocar hiperatividade, reações alérgicas, eczema e asma, principalmente em crianças (QUEIROZ; STEFANELLI, 2011).

A ingestão de alimentos é uma das mais comuns vias de exposição do homem à diferentes compostos, ao passo que uma mistura complexa de agentes químicos é frequentemente encontrada na sua dieta. Determinadas substâncias presentes nos alimentos podem ter efeitos mutagênicos e/ou carcinogênicos ou podem favorecer o desenvolvimento de tumores enquanto outras podem enfatizar ou anular estes efeitos. Inúmeras pesquisas científicas têm enfatizado a importância da dieta para o risco de desenvolvimento do câncer (ANTUNES; ARAÚJO, 2000).

A fim de se determinarem os eventuais efeitos nocivos de uma substância química ou dos seus derivados, a mesma deve ser submetida a testes e a uma avaliação de toxicidade

adequada. Todos os agentes químicos devem ser mantidos sob observação permanente e avaliados sempre que for necessário, tendo em vista as variações das condições de utilização e de novos dados científicos (BAPTISTA, 2003). Em adição, a ANVISA (2007) considera que há a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando à proteção da saúde da população, além da necessidade de segurança do uso de substâncias químicas na fabricação de alimentos. Somando-se a isso, o seu uso deve ser limitado a alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado, por isso é necessário atualizar a sua regulamentação, como por exemplo, a dos aromatizantes em alimentos.

Diante da necessidade de determinar os efeitos nocivos a nível celular os bioensaios com plantas têm sido considerados bastantes sensíveis e simples no monitoramento dos efeitos citotóxicos de compostos químicos (USEPA) (IGANCI et al., 2006).

Em trabalhos realizados por Gomes et al. (2013) e Oliveira et al. (2013) avaliando a citotoxicidade de aditivos alimentares pertencentes ao grupo dos corantes usando *Allium cepa* como sistema teste vegetal, indicou citotoxicidade com o uso dos compostos químicos o amarelo tartrazina e vermelho 40, onde o primeiro mostrou ação antiploriferativa e potencial para causar aberrações celulares que confirmaram com resultados obtidos por outros pesquisadores em outros testes de sistema indicando que este aditivo alimentar tem atividade citotóxica. E o segundo alteração do índice de divisão celular como também induziu o aparecimento de aberrações celulares significativas nas suas doses testadas mostrando atividade citotóxica e mutagênica em nível celular, porem na literatura encontrou escassez de trabalhos recentes com o corante vermelho 40 onde os poucos foram realizados na década de 80 em que alguns encontraram se resultados satisfatórios e outros contraditórios em relação ao trabalho em questão onde a escassez de informações sobre o aditivo vermelho 40 torna-se preocupante porque este é amplamente utilizado no mercado de alimentos, especialmente pelas indústrias brasileiras, indicando-se a necessidade de estudos adicionais para avaliar a atividade deste corante alimentar. Os resultados reforçam a importancia do teste de *Allium cepa* por apresentar resultados satisfatorios com outros bioensaios.

Dessa forma, é importante realizar trabalhos, em sistemas testes diferentes, que avaliem a toxicidade, como por exemplo em nível celular, dos aromatizantes alimentares sintéticos, condição que corrobora com a citação da própria ANVISA (2007) que relata a necessidade constante de aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, com intuito de preservar a saúde da população, além da necessidade de segurança de uso de compostos químicos na constituição de alimentos.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia aplicada a Saúde e Meio Ambiente (NUPBSAN) do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí, Município de Picos, Estado do Piauí, no período entre Maio do ano de 2014 a Julho do ano de 2014.

#### 3.1 Obtenção do aromatizante alimentar e definição das doses

O aromatizante alimentar sintético salgado e líquido de sabor Cebola foi adquirido de uma revendedora especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos localizada na região nordeste do Brasil. O aromatizante, de aspecto oleoso, estava acondicionado em frasco âmbar com capacidade para 100 ml e encontrava-se no prazo de validade. No rótulo do produto sugeria-se 1 ml de aromatizante para 300g de massa, sugestão está presente no rótulo deste tipo de aromatizante das principais marcas brasileiras especializadas na produção de aditivos alimentares. Utilizou-se cebolas com, em média 300g, reproduzindo assim a dose (tratamento) sugerida 1,0 ml e esta concentrada na escala 2,3 e 4 vezes, respectivamente.

É importante explicar que para avaliação do potencial citotóxico do aromatizante em questão nenhuma diluição foi realizada para a definição das doses, ou seja, teve-se o intuito de verificar a toxicidade do aromatizante nas raízes de *A. cepa* direto na solução presentes nos frascos. Optou-se por fazer desta forma em função do receio de que alguns componentes presentes no aromatizante fossem alterados. Também é importante relatar que a constituição química dos aromatizantes, em geral, é padronizada no mundo inteiro, condição esta estabelecida pela EFSA.

#### 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 2,0 cm de comprimento. Para análise de cada dose (solução) estabeleceu-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebola. 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 suas respectivas soluções, 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 doses em mais de um ciclo celular.

Durante a realização da pesquisa tomou-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 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, assim determinado o índice mitótico. Avaliou-se também a ação das doses por meio do número de células micronucleadas, de metáfases colchícnicas, 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

A partir dos resultados obtidos neste trabalho, Tabela 01, pode-se verificar que em todas as doses testadas do aromatizante sabor Cebola houve redução estatisticamente significativa do índice de divisão celular das células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, nos TE 24 e 48h em relação ao IM dos seus respectivos controles. Quando confrontados os valores de IM dos TE 24 e 48h de uma mesmo tratamento entre si, foi observado que nas doses de 1,0; 2,0 e 3,0 ml os valores foram estatisticamente iguais. Já para a dose de 4 ml os valores obtidos para TE 24 e 48 h foram significativamente diferentes entre si, onde foi verificado que o IM diminuiu significativamente conforme o aumento do TE.

**Tabela 01-** Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa* tratadas com 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL do aromatizante alimentar sabor Cebola nos TE 24 e 48 horas.

Dose	TE	Células					Células em Divisão	IM (%)
		Indiferenciadas/ Intérfase	P	M	A	T		
1ml	CO	4.561	161	105	82	91	439	8,8 <sup>a</sup>
	24h	4.826	129	14	22	09	174	3,5 <sup>b</sup>
	48h	4.896	101	00	01	02	104	2,1 <sup>b</sup>
2ml	CO	4.454	270	86	58	132	546	10,9 <sup>a</sup>
	24h	4.874	101	16	09	00	126	2,5 <sup>b</sup>
	48h	4.871	124	05	0	00	129	2,6 <sup>b</sup>
3ml	CO	4.555	220	73	69	83	445	8,9 <sup>a</sup>
	24h	4.800	198	02	00	00	200	4,0 <sup>b</sup>
	48h	4.791	203	07	00	00	210	4,2 <sup>b</sup>
4ml	CO	4.637	159	77	59	68	363	7,3 <sup>a</sup>
	24h	4.829	169	02	00	00	171	3,4 <sup>b</sup>
	48h	4.957	38	05	00	00	43	0,9 <sup>c</sup>

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

Ainda na Tabela 1, é verificado que a maioria das células em divisão estão em prófase. Pode-se sugerir que os tratamentos avaliados interferiram na formação do fuso mitótico nas células do sistema teste utilizado. Porém, para verificação da atividade destas doses em relação a montagem do fuso mitótico, outros trabalhos devem ser realizados para a verificação desta condição.

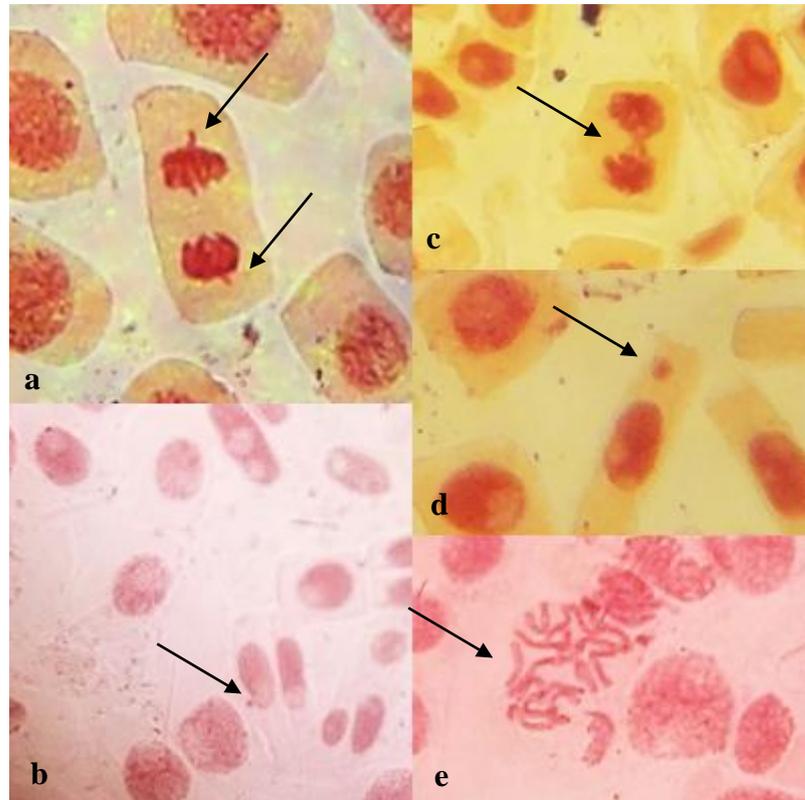
A partir dos resultados demonstrados na Tabela 02 verifica-se que todos os tratamentos promoveram anomalias de fuso mitótico e micronúcleos em número estatisticamente significativos as células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. Como pode ser observado, o número de micronúcleos foi superior ao de outras alterações nas quatro doses avaliadas.

**Tabela 02** - Número de pontes anafásicas e telofásicas, células micronucleadas, metáfases colchicínicas, ampliações e total de aberrações celulares encontrado em cada controle e nas doses de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL de aromatizante alimentar sabor Cebola.

Dose	TE	Pontes		Metáfase		Total de Aberrações Celulares
		Anafásica e Telofásica	Célula Micronucleada	Colchicínica	Amplificações	
1,0mL	CO	1	0	0	0	01 <sup>a</sup>
	24h	0	113	2	67	182 <sup>b</sup>
	48h	13	125	22	0	160 <sup>b</sup>
2,0mL	CO	1	0	0	0	01 <sup>a</sup>
	24h	27	175	0	0	202 <sup>b</sup>
	48h	2	118	33	0	153 <sup>b</sup>
3,0mL	CO	1	0	0	0	01 <sup>a</sup>
	24h	0	125	4	2	131 <sup>b</sup>
	48h	0	147	0	5	152 <sup>b</sup>
4,0mL	CO	0	0	0	0	00 <sup>a</sup>
	24h	1	158	5	0	164 <sup>b</sup>
	48h	7	179	0	0	186 <sup>b</sup>

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

**Figura 01** – Prancha das aberrações celulares encontradas nas células tratadas com as doses do aromatizante sabor cebola.



a. Duas ampliações Telo-fásicas. b. Amplificação em células não diferenciadas. c. Pontes Telo-fásicas com 2 braços cromossômicos. d. Célula Micronucleada. e. Metáfase Colchicínica. Fonte: produção do *próprio autor*.

Nas condições analisadas, as doses do aromatizante sabor cebola foram citotóxicas, pois demonstraram grande potencial antiproliferativo, e mutagênicas, por terem ocasionado micronúcleos e anomalias de fuso mitótico as células do sistema teste utilizado. Infelizmente, não foram encontrados na literatura científica trabalhos avaliando a toxicidade em nível celular deste aromatizante alimentar. De acordo com Honorato et al. (2013), os aromatizantes são os aditivos alimentares menos estudados do ponto de vista toxicológico.

No Brasil, a Agência de Vigilância Sanitária - ANVISA (2007) relatou que doses elevadas de aromatizantes alimentares podem provocar ações irritantes e narcóticas ao organismo. Também podem produzir toxicidade crônica ao trato digestório a longo prazo, sempre que utilizados de maneira indiscriminada. Embora, Salinas (2002), concorde com esta informação ele declara que quando os aromatizantes alimentares são utilizados em baixas doses não promovem risco a saúde humana. Já quando as doses são elevadas, podem provocar ações irritantes e narcóticas e toxicidade crônica a longo prazo, sempre que empregados em doses superiores as recomendadas. No entanto este autor, da mesma forma que a ANVISA (2007), não especifica quais são as doses consideradas altas e baixas. Também na define

quem são os aromatizantes que possuem este tipo de ação. Dessa forma, e segundo Honorato et al. (2013), verifica-se que embora a utilização de aromatizantes seja permitida pelo Ministério da Saúde e ANVISA, torna-se necessário e urgente estudos para se determinar com propriedade potencial tóxico destes aditivos alimentares.

Portanto, pelos resultados obtidos neste trabalho e pela falta de estudos de avaliação toxicológica sobre o aromatizante alimentar sabor cebola, sugere-se que outros estudos de toxicidade em nível celular sejam realizados utilizando outros sistemas testes, entre eles animais, visto que o teste com *A. cepa* foi apenas o primeiro screening de citotoxicidade, para auxiliar e orientar os órgãos regulamentadores, bem como as indústrias alimentícias, a definirem com segurança a ingestão diária aceitável (IDA) para utilização deste aditivo alimentar.

## **5 CONCLUSÃO**

As doses avaliadas do aromatizante alimentar sabor Cebola foram citotóxicas e mutagênicas ao sistema teste utilizado.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 06 junho, 2014.

AISSA, AF. **Avaliação da atividade antimutagênica do beta-caroteno microencapsulado em células de ratos tratados com o antitumoral doxorubicina empregado os ensaios de micronúcleo e cometa.** São Paulo: Faculdade de ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo; 2010.

AIUB, C.A.F.; FELZENSZVALB, I. **O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares.** Genética na Escola, Rio de Janeiro, v.1, n.06, p.12-15, 2011.

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.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Considerações sobre o Uso do Edulcorante Aspartame em Alimentos.** Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acesso em: 10 de julho de 2014.

ARUNG, E. T.; FURUTA, S.; ISHIKAWA, H.; TANAKA, H.; SHIMIZU, K.; KONDO, R. **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. 209-14, 2011.

B. Nair. **Final report on the safety assessment of benzyl alcohol, benzoic acid, and sodium benzoate,** Int. J. Toxicol, pp. 23–50, 2001.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar o processamento de alimentos.** Forvisão – Consultoria em Formação Integrada. 1ed. 2003.

BESSONOV, V. V.; MALINKIN, A. D.; PEREDERIAEV, O. I.; BOGACHUL, M. N.; VOLKOVICH, S. V.; MEDVEDEV, I. V. **Development of methods for determining acrylamide in food products by gas-liquid chromatography.** Voprosy Pitanni, v. 80, n. 2, p. 4, p. 70-83, 2011.

BURGE, P.S.; O'brien, I.M.; Harries, M.G. **Occupational asthma due to inhaled carmine.** Clin Allergy, 1979.

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, 2008

CARVALHO, Paulo Roberto de. **Aditivos dos Alimentos.** Faculdade de filosofia Ciências e Letras de São José do Rio Pardo. Revista Logos Nº 12. São José do Rio Pardo, 2005.

CHEESEMAN, M. A. **Artificial food color additives and child behavior.** Environmental Health Perspectives, v. 20, n.1, p.15-16, 2012.

Costa, P. R. R. **Safrol e eugenol: Estudo da reatividade química e uso em síntese de produtos naturais biologicamente ativos e seus derivados.** Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro – RJ. **QUÍMICA NOVA**, 2000.

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

FDA and Monosodium Glutamate (MSG). U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Food and Drug Administration (FDA) Backgrounder August 31, 1995. Disponível em: <<http://vm.efsan.fda.gov/~dms/eafus.html>>. Acesso em: 10 de Jul de 2014.

G.D.E. Njagi and H.N.B. Gopalan, **Cytogenetic effects of the food preservatives—sodium benzoate and sodium sulphite on Vicia faba root meristems.** Mutat. Res, pp. 213–219, 1982.

GERAS`KIN, S.; OUDALOVA, A.; MICHALIK, B.; DIKAREVA, N.; DIKAREV, V. **Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means *Allium* test.** Chemosphere, v. 83, n. 8, p. 1133-1146, 2011.

GOMES, K M.; PERON, A P.; Virna, M. A.; CARVALHO, F. R. **Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristem cells.** *Ciência e Tecnologia de Alimentos (Online)*<sup>JCR</sup>, v. 33, p. 218-223, 2013.

HERRERO, O.; PEREZ, J. M. M; FERNÁNDEZ, P. F. **Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test.** Mutation Research, v. 743, n. 1-2, p. 24-34, 2012.

HONORATO. C. T.; BATISTA. E.; NASCIMENTO. O.K.; PIRES. T. **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.; BROBOWSKI, G.; HEIDEN, G. V. C.; STEIN, L.; ROCHA, B. H. G. **Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação e índice mitótico de *Allium cepa* L.** Arquivos do Instituto de Biologia, v. 73, n. 1, p. 79-82, 2006.

L. DÖNBAK, E.; Rencüzoğulları and M. Topaktaş. **The cytogenetic effects of the food additive boric acid in *Allium cepa* L.,** Cytologia 67, pp. 153–157, 2002.

LIMA, G.F. **Aditivos alimentares: definições, tecnologia e reações adversas.** VEREDAS FAVIP - Revista Eletrônica de Ciências. v. 4, n. 2, Dez. 2011.

LUERCE, R. F. **Produção de acetoína por *Bacillus polymyxa*.** Programa (Pós Graduação). Universidade Federal De Santa Catarina, Florianópolis, f.83, 2008.

MAGALI, R. F. **A leitura de rótulo de produto alimentício na escola.** Dissertação (Mestrado em linguística aplicada). Universidade de Taubaté. Taubaté, f.101, 2006.

MATSUMOTO, S. T.; MANTOVANI, M. S.; MALAGUTTI, M. I. A.; DIAS, A. L.; FONSECA, I. C.; MARIN-MORALES, M. A. **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. 148-158, 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.

MITTAL, A.; MITTAL, J.; KURUP, L.; SINGH, A. K. **Process development for the removal and recovery of hazardous dye erythrosine from wastewater by waste materials – Bottow Ash and De-Oiled Soya as adsorbents.** Journal of Hazardous Materials, v. 138, n. 1-2, p. 95-105, 2006.

NUNES, E. A. et al. **Genotoxic assessment on river water using different biological systems.** Chemosphere, v. 84, n. 1, p. 47-53, 2011.

OLIVEIRA, M.V. A.; PERON, A. P.; Castro, J. M. de S.; Lima, L. H. G. de M. **Cytotoxicity of erythrosine (E-127), brilliant blue (E-133) and red 40 (E-129) food dyes in a plant test system.** Acta Scientiarum. Biological Sciences (Online), v. 35, p. 557-562, 2013

QUEIROZ, C. F.; STEFANELLI, T. **Biodegradação de corantes têxteis por *Anabaena flos-aqual*.** Engenharia Ambiental, v. 8, n. 1, p. 26-35, 2011.

RIZZINI, C. T. e Mors, W. B. **Botânica Econômica Brasileira**, EPU/EDUSP, São Paulo, 1976; b, Amorim, M. B., Dissertação de Mestrado, Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN)-UFRJ, 1989; c, Lopes, C. C., Dissertação de Mestrado, NPPN-UFRJ, 1983.

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

SCHVARTSMAN, S. **Aditivos alimentares.** Pediatria – São Paulo, 1982.

SHEPHARD, S.E., WAKABAYASHI, K., NAGAO, M. **Mutagenic activity of peptides and the artificial sweetener aspartame after nitrosation.** Food and Chemical Toxicology, Oxford, v.31, n.5, p.323-329, 1993.

SPELLMEIER, J. G.; STULP, S. **Avaliação da degradação e toxicidade dos corantes alimentícios eritrosina e carmim de cochonilha através de processo fitoquímico.** Acta Ambiental Catarinense, v. 6, n. 1, p. 65-83, 2009.

TABREZ, S.; SHAKIL, S.; UROOJ, M.; DAMANHORI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; AHMAD, M. **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. 250-275, 2011.

TONETTO, A.; et al. **O Uso de Aditivos de Cor e Sabor em Produtos Alimentícios.** Tecnologia de Alimentos. São Paulo: Faculdade de ciências farmacêuticas, nov.2008.

VALSECHI, Octávio Antônio. **Aditivos**. Universidade Federal de São Carlos Centro de Ciências Agrárias. São Paulo: Araras, 2001.

VARELA, P., FISZMAN, S.M. **Exploring consumers' knowledge and perceptions of hydrocolloids used as food additives and ingredients**. Food Hydrocolloids, v.30, n.1, p.477-484, Jan., 2013.

WHITTAKER, P.; JANE, J.; CLARKE, R. H. C.; TIMOTHY, H. B.; VIRGINIA, C. D. **Food and Chemical Toxicology**, v.46, p. 2928-2933, aug. 2008.

WHO. **Food additive series**, No. 5, Geneva, Report. 1974.

Wilson, B.G.; Bahna, S.L. **Adverse reactions to food additives**. Ann Allergy Asthma Immunol, 2005.