

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

SARA IOLANDA OLIVEIRA DA SILVA

**TOXICIDADE EM NÍVEL CELULAR DE AROMATIZANTES ALIMENTARES
SINTÉTICOS AVALIADOS ASSOCIADOS ENTRE SI EM DIFERENTES DOSES.**

PICOS, PIAUÍ

2015

SARA IOLANDA OLIVEIRA DA SILVA

Toxicidade em nível celular de aromatizantes alimentares sintéticos avaliados associados entre si em diferentes doses.

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

2015

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca José Albano de Macêdo

S586t Silva, Sara Iolanda Oliveira da.

Toxidade em nível celular de aromatizantes alimentares sintéticos avaliados associados entre si em diferentes doses / Sara Iolanda Oliveira da Silva . – 2015.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (45 f.)

Monografia(Licenciatura em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Piauí, Picos, 2015.

Orientador(A): Profa. Dra. Ana Paula Peron.

1. Citotoxicidade. 2. Genotoxicidade. 3. Aromatizantes Alimentares I. Título.

CDD 581.4

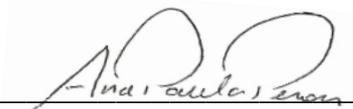
SARA IOLANDA OLIVEIRA DA SILVA

**TOXICIDADE EM NÍVEL CELULAR DE AROMATIZANTES ALIMENTARES
SINTÉTICOS AVALIADOS ASSOCIADOS ENTRE SI EM DIFERENTES DOSES.**

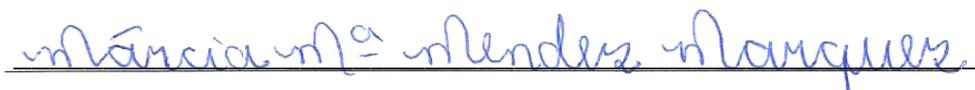
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 29 / 06 / 2015

BANCA EXAMINADORA



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



Profa Dra Márcia Maria M. Marques
Curso de Ciências Biológicas – UFPI



Prof. Dr. Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva
Curso de Ciências Biológicas – UFPI

Aos meus pais, que sempre me incentivam e me apoiam em todas as minhas decisões.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades. Á minha família, principalmente a meus pais que sempre estiveram ao meu lado me dando amor, carinho, valores éticos e morais, e pelo apoio incondicional. A Universidade Federal do Piauí , seu corpo discente, direção e administração que oportunizaram a janela que hoje vislumbro um horizonte superior.

A Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Peron, pela orientação, colaboração, paciência, atenção e acima de tudo obrigada pela confiança, que foi algo crucial na minha formação, para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Muito obrigado por me ensinar a crescer dentro do mundo acadêmico e a alcançar voos mais altos.

Aos amigos da universidade, Ediane Rodrigues, Theresa Cristina, Cleidisson Carvalho, Drielly Nunes, Kassia Silva, Vanessa Luz, Larissa Vieira, Andressa Vieira, Anne Monteiro, Deassis Alves, Alikeane Sá, que estiveram comigo no decorrer desses cinco anos de curso, levarei vocês pra sempre em meus pensamentos e orações.

Ao os meus amigos Layse Leal, Marina Rodrigues, Manuela Rodrigues, Maria de Sousa, Francielton Lopes 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 a cada um de vocês por fazerem parte da minha vida.

A minha amiga e companheira de laboratório, Ila Monise que foi meu braço direito, sempre estava presente quando eu precisava, perdia fins de semana mesmo sem poder, mas estava ao meu lado e a mesma foi de grande importância para que eu concluísse este trabalho.

Aos professores que tive o prazer de conhecer e obter ensinamentos e conhecimentos repassados com tanto amor pelos mesmos. E a aqueles que estiveram direta ou indiretamente contribuindo para essa conquista, a todos o meu muito

OBRIGADA!!!

“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e semeando, no fim terás o que colher”.

(Cora Coralina)

RESUMO

Em função de sua relevância tecnológica para a indústria alimentícia, os aditivos alimentares devem ser constantemente avaliados quanto aos seus potenciais toxicológicos. Assim, objetivou-se nesta pesquisa analisar a citotoxicidade e genotoxicidade de aromatizantes alimentares sintéticos, idênticos aos naturais, de Chocolate, Morango e Leite Condensado. Esta avaliação ocorreu por meio das células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L., nos tempos de exposição de 24 e 48 horas e nas doses de 0,2; 0,4 e 0,6 ml, em associação, onde para uma das três doses de um dos aromatizantes associou-se uma dose diferente de um dos outros dois aditivos de aroma em estudo. Em seguida, as raízes foram fixadas em solução de Carnoy, hidrolisadas em ácido clorídrico e coradas com orceína acética. Analisou-se, em microscópio óptico em aumento de 40x, 5.000 células para cada grupo tratamento, e utilizou-se o teste estatístico Qui-quadrado a 5% para análise dos dados. A partir dos resultados, verificou-se que todos os tratamentos decorrentes das associações entre os aromas Chocolate/Morango e Morango/Leite Condensado reduziram, nos dois tempos de exposição considerados, a divisão celular das raízes *A. cepa*, mostrando-se citotóxicos. Já os tratamentos provenientes da associação entre os aditivos Chocolate/Leite Condensado não alteraram de forma significativa os índices mitóticos das células do tecido em análise. Também foi possível inferir que o aditivo de Morango foi o mais citotóxico dos aditivos em estudo. Nenhuma das associações avaliadas foi genotóxica nestas condições de estudo.

Palavras-chave: aditivos de aroma e sabor; citotoxicidade; genotoxicidade; *Allium cepa*.

ABSTRACT

The technological relevance of food additives for the food industry requires constant evaluations as to their toxicological potential. In this way, this study aimed to examine the cytotoxicity and genotoxicity of synthetic flavorings, nature identical Chocolate, Strawberry and Condensed Milk. This evaluation was performed in root meristem cells of *Allium cepa* L., in exposure times of 24 and 48 hours and using doses of 0.2; 0.4 and 0.6 mL, in combination, in which one of the three doses of a flavoring was combined with a different dose of one of the two other flavor additives studied. Roots were fixed in Carnoy's solution, hydrolyzed in hydrochloric acid, stained with acetic orcein and then analyzed, under light microscopy at 40x magnification, 5,000 cells for each treatment. For data analysis, it was used Chi-square test at 5%. All the treatments derived from combinations between the flavorings Chocolate/Strawberry and Strawberry/Condensed Milk reduced, in both exposure times considered, cell division of *A. cepa* roots, proving to be cytotoxic. In turn, the treatments from the association of the additives Chocolate/Condensed Milk did not change significantly the mitotic index of the cells analyzed. The Strawberry flavoring was the most cytotoxic among the additives tested. None of the evaluated associations was genotoxic under the study conditions.

Key words: aroma and flavor additives; cytotoxicity; genotoxicity; *Allium cepa*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | |
|--|----|
| Quadro 01 - Classes de Aditivos Alimentares..... | 15 |
| Figura 01 - Imagem dos aromatizantes utilizados..... | 23 |
| Figura 02 - Imagem dos bulbos de <i>Alium</i> cepa em agua destilada..... | 25 |
| Figura 03 - Imagem das principais fases da divisão mitótica | 26 |
| Figura 04 - Imagem com as principais alterações encontradas nos tratamentos feitos com aromatizantes..... | 27 |

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Número de células observadas em cada fase do ciclo celular de tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com os aromatizantes alimentares sintéticos, idênticos aos naturais, de Chocolate e Morango associados entre si em diferentes doses, nos TE 24h e TE 48h. As doses em estudo foram: 0,2; 0,4 e 0,6 ml.....28

Tabela 02 – Número de células observadas em cada fase do ciclo celular de tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com os aromatizantes alimentares sintéticos, idênticos aos naturais, de Chocolate e Leite Condensado, associados em diferentes doses, nos TE 24 e TE 48 h. As doses em estudo foram: 0,2; 0,4 e 0,6 ml.....30

Tabela 03 – Número de células observadas em cada fase do ciclo celular de tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com os aromatizantes alimentares sintéticos, idênticos aos naturais, de Morango e Leite Condensado, associados em diferentes doses, nos TE 24 e TE 48 h. As doses em estudo foram: 0,2; 0,4 e 0,6 ml.....31

SUMÁRIO

| | |
|--|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 12 |
| 2 REFERENCIAL TEÓRICO | 15 |
| 3 MATERIAIS E MÉTODOS | 23 |
| 3.1 Obtenção dos aromatizantes alimentares..... | 23 |
| 3.2 Definição das doses..... | 23 |
| 3.3 Obtenção das células meristemáticas de raízes de A. cepa e análise citogenética | 25 |
| 3.4 Preparo e leitura das lâminas, e análise estatística..... | 26 |
| 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 28 |
| 5 CONCLUSÃO..... | 37 |
| 6 REFERÊNCIAS..... | 38 |

1 Introdução

Há várias décadas os aditivos alimentares, como os corantes, conservantes, acidulantes e aromatizantes, são imprescindíveis para a indústria alimentícia, em função de, entre outras características, permitirem maior tempo de armazenamento aos alimentos industrializados sem alterá-lo quanto a cor, sabor, aroma e textura (LERNER et al., 2015). São amplamente utilizados em lanches *fast food*, pratos prontos congelados, sobremesas industrializadas e produtos alimentícios enlatados e empanados.

Os aditivos de aroma e sabor, devido as suas propriedades odoríferas e sápicas, proporcionam e/ou intensificam o aroma e o sabor dos alimentos sem o propósito de nutrir (MOODIE et al., 2013). São classificados como naturais, sintéticos idênticos aos naturais e sintéticos artificiais de reação ou transformação (PIERCE et al., 2014). Possuem formulação química complexa, constituída por onze classes de compostos – os diluentes, antioxidantes, antiespumantes, conservantes, emulsificantes, estabilizantes, reguladores de acidez, realçadores de sabor, antiuamectantes, antiaglutinantes, corantes e solventes de extração e processamento (LERNER et al., 2015) - e aceita em âmbito mundial pelas agências regulamentadoras *Codex Alimentarius Commission*, *Food and Drug Administration* (FDA), *Flavour and Extract Manufactuers Association* (FEMA), e nacionalmente pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (ANVISA,2007, OLIVEIRA et al., 2013). No entanto, estes órgãos de vigilância em seus documentos técnicos não explicitam quais compostos em específico e suas concentrações estão presentes nestes aditivos, e nem o índice de Ingestão Diária Aceitável (IDA) e as doses limites toleráveis de aromatizantes para cada tipo alimento (GOMES et al., 2013, MARQUES et al., 2015).

Dessa forma, Honorato et al. (2014) e Lerner et al. (2015) relatam que a utilização dos aditivos de aroma e sabor suscita uma série de dúvidas quanto a sua toxicidade em nível sistêmico e celular, e declaram ser urgente a realização de pesquisas que avaliem seus potenciais toxicológicos. Em consonância as observações feitas por estes pesquisadores, as agências *Codex Alimentarius Commission*, FEMA (KONISHI; HAYASH; FUKUSHIMA, 2011) e ANVISA (2007) ressaltam em seus

regulamentos sobre a necessidade constante de estudos toxicológicos de efeito agudo envolvendo os aditivos alimentares em geral. Os resultados destas pesquisas são muito importantes, visto que indicarão ou não a necessidade de estudos de avaliação dos efeitos tóxicos crônicos desencadeados por tais ingredientes. Citam ainda, que os resultados obtidos a partir destas análises são a base de elaboração ou modificação de estratégias das agências reguladoras e, conseqüentemente, de atuação dos profissionais responsáveis pela vigilância alimentar e nutricional da população.

Os bioensaios vegetais são considerados bastantes sensíveis e simples no monitoramento dos efeitos citotóxicos de compostos químicos (USEPA) (HERRERO et al., 2012, LACERDA; MALAQUIAS; PERON, 2014) e a *Allium cepa* L. (cebola), por meio da região meristemática de suas raízes, é tida no meio científico como um eficiente organismo teste para a avaliação de toxicidade aguda em nível celular (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008, CARDOSO et al., 2014). Este organismo de prova possui excelentes propriedades cinéticas de proliferação, cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$) o que facilita a detecção de aberrações celulares e de fuso mitótico (HERRERO et al., 2012, NEVES et al., 2014). Também permite a verificação de alterações no índice de divisão celular ou mitótico quando exposto a compostos químicos com potencial ação citotóxica (LEME; MARIN-MORALES, 2009, TABREZ et al., 2011).

Segundo Herrero et al. (2012) o sistema *A. cepa* é muito eficiente para avaliações de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade de compostos químicos ou para validação destas condições após a realização de pesquisas em outros bioensaios. Ainda, demonstra, em grande parte das vezes, similaridade satisfatória aos resultados obtidos com outros bioensaios (CARDOSO, 2014). Como exemplo pode-se citar os trabalhos realizados por Gomes et al. (2013) e Oliveira et al. (2013) que avaliaram em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* o potencial tóxico de corantes sintéticos utilizados na indústria de alimentos e obtiveram resultados semelhantes aos obtidos em sistemas testes animais e com culturas de células.

Assim, mediante ao que foi exposto, objetivou-se neste trabalho avaliar, por meio das células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, em diferentes doses e de forma

associada, a toxicidade de aromatizantes alimentares sintéticos, idênticos aos naturais, de Morango, Chocolate e Leite Condensado. Estes aditivos foram escolhidos para estudo em função de sua ampla utilização na indústria em alimentos industrializados doces, quase sempre associados entre si, e também pelo fato de ser quase inexistente na literatura científica trabalhos de avaliação toxicológica sobre os mesmos.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

A necessidade de se preservar os alimentos é antiga, não é de hoje que os aditivos alimentares vêm sendo utilizados, tão antigos quanto as primeiras civilizações eles já estão presentes na dieta humana há muito tempo. Os primeiros seres humanos descobriram que era possível preservar alguns tipos de alimentos como carnes e peixes com sal ou salitre, além de ervas e temperos que ajudavam a realçar o sabor dos alimentos (AUN et al., 2011).

Devido ao crescimento do mercado, a grande diversidade de produtos e consumidores mais exigentes, a indústria alimentícia tem procurado melhorar o processamento dos alimentos utilizando-se da adição de aditivos alimentares que conferem características diferenciais, permitindo assim uma maior durabilidade do alimento, buscando satisfazer as necessidades dos seus consumidores (BAPTISTA; VENÂNCIO, 2003).

Sabe-se ainda que os aditivos são utilizados em todo o mundo, pois estão presentes em grande parte dos alimentos que são ingeridos diariamente. As indústrias dispõem de um grande número de técnicas para conservação e aprimoramento de alimentos, que garantem a disponibilidade destes, além da inovação de produtos e adequação ao paladar das pessoas (CARVALHO, 2005). As indústrias de alimentos são as que mais prosperam mundialmente, e a de doces possui uma posição de destaque, aumentando, a cada ano, o seu o faturamento e a competitividade. Grande parte deste sucesso é devido aos aditivos alimentares utilizados na confecção dos alimentos industrializados (MARMITTI; PIROTTA; STULPIS, 2010).

De acordo com Valsechi (2001), os aditivos alimentares desempenham variadas funções destacando-se principalmente as do quadro abaixo:

Quadro 1 – Classes de Aditivos Alimentares.

| Classe de aditivo | Função |
|-------------------------------------|--|
| Corantes | Coloração dos produtos |
| Aromatizantes (ou flavorizantes) | Alteração do aroma/sabor |
| Edulcorantes | Adoçar produtos mesmo em pequena quantidade |
| Conservantes | Ajudar os produtos a ter maior durabilidade |
| Antioxidantes | Evitar que óleos e gorduras dos alimentos combinem com oxigénio tornando-se rançosos |
| Antiumectantes | Evitar que os produtos secos se humedecem |
| Espessantes | Aumentar a viscosidade de alimentos, geralmente na forma líquida |
| Estabilizantes | Promover uma integração homogénea de ingredientes como óleo e água, por exemplo, que normalmente se separariam |
| Umectantes | Manter húmidos os alimentos evitando o seu ressecamento; |
| Acidulantes | Aproximar o sabor dos produtos da acidez da fruta que dá nome ao produto |
| Antiespumíferos | Evitar a formação de espumas em alimentos líquidos, durante seu processo de fabricação, ou produto final |

Fonte: Valsechi, 2001.

Gouveia (2006) relatou que a indústria brasileira de ingredientes e aditivos fatura anualmente cerca de R\$ 2 bilhões. Aproximadamente 50% desse faturamento são

provenientes do aroma e o restante da somatória agrega todos os outros aditivos. Lima (2011) relata que os aromatizantes alimentares são substâncias que conferem ou intensificam o aroma dos alimentos com finalidade de conferir ou intensificar o sabor, podem ser subdivididos em essência natural, essência sintética, produto aromático, sávido, volátil e oleoso, extraído de vegetais, enquanto que o extrato vegetal aromático é um produto aromático e sávido obtido.

Os aromas sintéticos como compostos quimicamente definidos obtidos por processos químicos e compreende os aromatizantes artificiais e aromatizantes idênticos a os naturais. Os aromatizantes idênticos ao natural são substâncias também quimicamente definidas obtidas por sínteses e aqueles isolados por processos químicos a partir da matéria-prima de origem animal, vegetal ou microbiana. Segundo Tonetto et al. (2008) essas apresentam uma estrutura química idêntica nas referidas matérias primas. O aroma é de grande importância na alimentação, pois ele é responsável pela caracterização do sabor de um alimento aumentando sua aceitabilidade.

O FDA (*Food and Drug Administration*) já autorizou nos Estados Unidos o uso de mais de 3.000 aditivos alimentares. Segundo a Associação brasileira de Alergias e Imunopatologia (AUN et al., 2011), por se tratarem de substâncias químicas intencionalmente adicionadas aos alimentos, torna-se fundamental conhecer suas propriedades, de maneira a garantir seu uso adequado e seguro. No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2007) é o órgão responsável por regulamentar o uso dos aditivos alimentares e os coadjuvantes de tecnologia de fabricação, conforme disposto na Lei no. 9782, de 26 de janeiro de 1999. Ela ressalta que apesar da grande vantagem observada pela indústria alimentícia na utilização de aditivos em alimentos, existe a preocupação constante quanto aos riscos toxicológicos potenciais decorrentes da ingestão diária dessas substâncias químicas.

A Associação Brasileira de embalagens (ABRE), de acordo com o Informe Técnico nº 26 de 14 de junho de 2007 publicado pela Anvisa, a indicação do aroma nos rótulos dos alimentos deve ser feita descrevendo o tipo de aromatizante utilizado, com o dizer Natural, Artificial, Sabor, Sabor artificial de, Idêntico ao natural, Aromatizante artificial, dentre outros. Uma vez que a obrigatoriedade da indicação do

uso do aroma na rotulagem é determinada pelos artigos 14, 15, 16, e 17 do Decreto-Lei nº 986/69. Em relação ao uso associado de aromatizantes na fabricação de alimentos industrializados, conforme as legislações que dispõem sobre registro nas Resoluções nº. 23/2000 e 278/2005 da Anvisa, os aditivos inscritos na Farmacopeia Brasileira e aqueles autorizados segundo as Boas Práticas de Fabricação (BPF) estão dispensados da obrigatoriedade de registro.

Sendo assim, a Anvisa (2007) considera que há a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, tendo em vista a proteção da saúde da população, além da necessidade de segurança de uso de aditivos alimentares na fabricação de alimentos. Somando-se a isso, o uso dessas substâncias deve ser limitado a alimentos específicos, e em menor quantidade para alcançar o efeito desejado, sendo necessário atualizar a regulamentação sobre o uso de aditivos.

A Organização Internacional da Indústria de Aromatizantes (IOFI) em 2010 criou o *Iofi Code of Practice*, afim de estabelecer o Código de Boas Práticas, para fazer uso de melhores informações disponíveis sobre os aromatizantes. Esta organização apoia os trabalhos de entidades idôneas, tais como a *Food and Drug Administration* (FDA) que é o órgão governamental dos Estados Unidos da América responsável pelo controle dos alimentos (tanto humano como animal), a Agência Nacional de Gestão de Emergências (FEMA), o Conselho da Europa e outras, em seu esforço de avaliar, sob o ponto de vista toxicológico, as substâncias utilizadas no emprego desses compostos.

A "Standard Geral do Codex para Aditivos Alimentares " (GSFA , CODEX STAN 192-1995) estabelece as condições em que os aditivos alimentares autorizados podem ser utilizados em todos os alimentos , quer tenham ou não tenham sido previamente padronizada pelo Codex . Desde 1956 o *Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives (JECFA)* tem se reunido anualmente a fim de atualizar e estabelecer as normas de segurança dos aditivos alimentares (WU et al., 2013). O JECFA (2002) é responsável por estabelecer a Ingestão Diária Aceitável (IDA) de aditivos. O IDA é a quantidade expressa em miligramas do aditivo por quilo de peso corpóreo (mg/kg) que

deve ser ingerido diariamente, durante toda a vida do indivíduo sem ser prejudicial à saúde.

Segundo a ACS (*American chemical society, 2010*), existem mais de 80 mil tipos de substâncias químicas utilizadas pela Indústria alimentícia em todo mundo, o que só aumenta os riscos de intoxicação devidos as formulações complexas de seus compostos. Essa grande disponibilidade de compostos químicos na indústria alimentícia fez a toxicologia de alimentos adquirir importância, sendo ela responsável por buscar e estudar a natureza, fontes e formação de substâncias tóxicas encontradas em alimentos incluindo a verificação de efeitos nocivos e o estabelecimento de limites de segurança de determinados componentes (TORRES; MACHADO, 2001).

Salinas et al. (2002) cita que doses elevadas ingeridas de aditivos podem causar irritações, ou ações narcóticas ou até mesmo produzir toxicidade crônica em longo prazo, sempre que empregados a doses superiores às recomendadas. Corroborando com Salinas, Feng; Cerniglia; Chen (2009) relatam que atualmente, os hábitos alimentares associados ao estilo de vida expõem o homem a fatores de risco para o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis. Além destes fatores, dietas desequilibradas e amplamente constituídas por aditivos alimentares sintéticos, como temperos, conservantes, corantes,

Sasaki et al. (2002) determinou a genotoxicidade de 39 substâncias químicas utilizadas atualmente como aditivos alimentares. As análises feitas mostraram que de todos os aditivos, os corantes foram os mais genotóxicos, sendo que amaranço, vermelho allura, new coccine, tartrazina, eritrosina, floxina e rosa bengala são exemplos de corante que induziram danos ao DNA relacionados com a dose glandular no estômago, cólon e/ou bexiga. Testes feitos com o Diacetil (2,3 butanedione) um aromatizante líquido amarelo que normalmente é misturado com outros ingredientes para produzir o sabor manteiga apresentou uma resposta altamente mutagênica nos ensaios de mutação L5178Y do linfoma de ratos (Whitaker et al., 2008).

Os aromatizantes são considerados um avanço polêmico da indústria de alimentos devido sua formulação química complexa, 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, gerando uma série de dúvidas quanto a sua toxicidade em nível sistêmico e celular (SILVA et al., 2013; CHEESEMAN, 2012).

Diversos estudos comprovam efeitos agudos ou crônicos, como reação tóxica no metabolismo (KNEKT et al., 1999; SUGIMURA, 1982). 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 (ANTUNES; ARAÚJO, 2000). O efeito mutagênico é a decorrência de danos genéticos causados por agentes físicos, químicos e biológicos, induzido por mutações nas células de um organismo. Já o efeito antimutagênico, tem ação inversa impedindo a formação das mutações causadas por um determinado agente mutagênico (RIBEIRO; SALVADORE; MARQUES, 2003).

Ribeiro; Salvadore; Marques (2003) ainda declara que muitas mutações não aparecem como mudanças detectáveis na atividade metabólica da célula ou do organismo e, passando assim, despercebidas. Algumas podem determinar a morte celular e, conseqüentemente, também não são detectáveis. Portanto, apenas, um pequeno número de mutações, que acontecem em genes específicos, pode determinar vantagens para o organismo ou levar a um crescimento desordenado das células, alteração estas que podem ser transmitidas por diversas gerações.

Os efeitos tóxicos, só se manifestam em organismos se o agente tóxico alcançar locais específicos do organismo, em concentrações e tempo suficiente para produzir algum tipo de efeito (BARROS et al., 2008). Os fatores mais importantes que influenciam a toxicidade em um organismo são as formas de administração, a duração e frequência de exposição, sendo observados no interior das células, estas não estando livres de sofrer constantes alterações e mutações (RABELLO-GAY, 1991).

Além disso, seus efeitos adversos estão relacionados à frequência e quantidade de consumo por peso corporal, o que acaba atingindo mais as crianças devidas possuírem um peso menor, e conseqüentemente menor tolerância (POLÔNIO; PERES,

2009). De acordo com o IBGE (2010) há um crescente consumo de produtos industrializados de alimentos e um decrescente consumo de alimentos caseiros, o que gera um maior consumo de aditivos e uma maior preocupação por pesquisadores da área da Saúde.

Por isso, considerando os compostos químicos colocados continuamente à nossa disposição, recomenda-se que cada uma dessas substâncias sempre seja submetida a rigorosos testes quanto à sua capacidade carcinogênica e mutagênica (BAYNES; DOMINICZAK, 2000, SANSEVERINO; SPRITJER; FACCINI, 2001).

O teste de *Allium cepa* desenvolvido por Levan (1938) é uma ferramenta útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos. Além disso, é um teste viável pela elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez, facilidade de manipulação e da utilização de amostras sem tratamento prévio, determinando-se a diminuição do índice mitótico e da formação de aberrações cromossômicas (Leme; Marin- Morales, 2009).

O uso do bioindicador *A. cepa* (cebola) para testes de citotoxicidade foi validado por muitos pesquisadores que realizaram de forma conjunta testes em animais in vivo, obtendo 18 resultados similares (VICENTINI, 2001; TEIXEIRA et al., 2003), propiciando informações valiosas para a saúde humana. Através deste teste podem ser observados dois tipos de toxicidade. Observação de tumores, avaliação de crescimento de raízes e raízes torcidas, entre outros são os parâmetros macroscópicos. Os parâmetros microscópicos estão relacionados à caracterização do índice mitótico, na análise na taxa de divisão celular, aberrações cromossômicas, como cromossomos em anel, pontes cromossômicas, cromossomos pegajosos, que ocorrem principalmente nas fases de metáfase e anáfase e a formação de micronúcleos, como indicadores de anormalidade no DNA (Monarca et al., 2000).

A análise das alterações cromossômicas serve como um ensaio de mutagenicidade e é um dos poucos métodos para medir os danos diretos em sistemas expostos a possíveis mutagênicas ou agentes cancerígenos. Para permitir a avaliação dos efeitos ou danos que podem causar agentes mutagênicos, é necessário que o

sistema teste esteja em divisão mitótica constante, buscando identificar os efeitos tóxicos e alterações que ocorrem ao longo do um ciclo celular. O teste *A. cepa* tem sido amplamente utilizada para esta finalidade (SILVA et al., 2003).

Estudos feitos com o benzoato de sódio um aditivo alimentar muito usado pela indústria alimentícia, relatam um aumento do número basal de aberrações cromossômicas, diminuindo a taxa de mitoses (índice mitótico – I.M.) em *Allium cepa* (NJAGIE; GOPALAN, 1982; DÖNBAK; RENCU“ZOG“ULLARI; TOPAKTAS, 2002). Outro que apresenta alterações a nível celular é o ácido cítrico um flavorizante muito utilizado como preservante de alimentos que é encontrado em biscoitos, bolos, sopas, produtos à base de queijo, alimentos de bebês e margarinas (Hera, 2006).

Fiskjö (1993) ressaltou a importância dos sistemas teste vegetal, testes estes bastante utilizados em laboratórios de todo mundo que trabalham com genética toxicológica, sendo uma valiosa ferramenta para a determinação de contaminação ambiental, havendo um vasto banco de dados de substâncias químicas já testadas. O índice mitótico das células presentes nas raízes do *Allium cepa* é usado como indicador de proliferação adequada das células (Gadano et al., 2002).

Estudos com corantes alimentares realizados por Gomes et al. (2013) demonstra que os resultados de teste de toxicidade utilizando a espécie *A. cepa* ressalvam a importância deste sistema teste, pois o mesmo apresenta resultados semelhantes aos obtidos em outros ensaios, com isso mostra que são excelentes parâmetros de análise citotóxica, comprovando a importância desse sistema teste para análise citotóxica de aromatizantes artificiais.

O sistema teste *Allium Cepa* visa avaliar a capacidade de substâncias atuarem no “relógio celular”, ou seja, modificarem o tempo de proliferação destas células (GUERRA; SOUZA, 2002). Segundo Kurás et al. (2006), este sistema teste é de fácil preparação para análise, pois contém células meristemáticas em constante divisão, tem cromossomos grandes e em número baixo (16 cromossomos), além de ser facilmente corados e observados.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos aromatizantes alimentares.

Os aditivos de aroma e sabor, sintéticos idênticos aos naturais, de sabores , Morango, Chocolate e Leite Condensado (figura. 01) foram obtidos de uma indústria de fabricação de aditivos alimentares localizada na região nordeste do Brasil, especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos.

Figura 1- Aromatizantes utilizados.



3.2 Definição das doses.

No rótulo dos três aromatizantes estudados sugeria-se a utilização de 1,0 ml de aromatizante para 1,0 Kg de massa. Os bulbos de cebolas selecionados para este experimento pesavam, em média, 200 g. Assim, de forma proporcional ao recomendado nos frascos dos aditivos, foi definida inicialmente para este estudo a dose de 0,2 ml. Em seguida, estabeleceu-se duas outras, maiores que a considerada ideal, 0,4 e 0,6 ml. Estas doses foram analisadas em associação, conforme descrito abaixo:

Doses de Chocolate associadas a doses de Morango

Grupo tratamento: 0,2 ml Chocolate / 0,4 ml Morango;

Grupo tratamento: 0,2 ml Chocolate / 0,6 ml Morango;

Grupo tratamento: 0,4 ml Chocolate / 0,2 ml Morango;

Grupo tratamento: 0,4 ml Chocolate / 0,6 ml Morango;

Grupo tratamento: 0,6 ml Chocolate / 0,2 ml Morango;

Grupo tratamento: 0,6 ml Chocolate / 0,4 ml Morango;

Doses de Chocolate associadas a doses de Leite Condensado

Grupo tratamento: 0,2 ml Chocolate / 0,4 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,2 ml Chocolate / 0,6 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,4 ml Chocolate / 0,2 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,4 ml Chocolate / 0,6 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,6 ml Chocolate / 0,2 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,6 ml Chocolate / 0,4 ml Leite Condensado.

Doses de Morango associadas a doses de Leite Condensado

Grupo tratamento: 0,2 ml Morango / 0,4 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,2 ml Morango / 0,6 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,4 ml Morango / 0,2 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,4 ml Morango / 0,6 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,6 ml Morango / 0,2 ml Leite Condensado;

Grupo tratamento: 0,6 ml de Morango / 0,4 ml Leite Condensado

3.3 Obtenção das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* e análise citogenética.

Os bulbos de cebola foram colocados em frascos aerados com água destilada (figura. 02), à temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$), até a obtenção de raízes de 2,0 cm de comprimento. Para análise de cada grupo tratamento estabeleceu-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebola. Antes de colocar as raízes em contato com os seus respectivos tratamentos, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em suas respectivas soluções por 24 horas, procedimento este denominado de tempo de exposição 24 horas (TE 24 h).

Figura 2- Bulbos de *allium cepa* L. em frascos com água destilada.



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

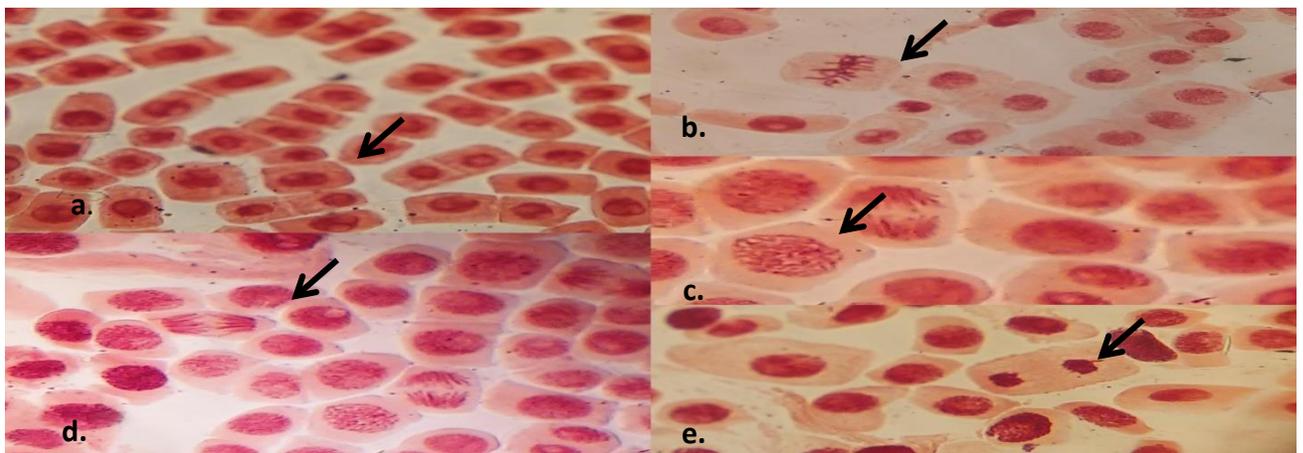
grupos tratamentos em mais de um ciclo celular. A fixação das raízes se deu em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas. Em cada coleta, retirou-se, em média, três raízes por bulbo.

3.4 Preparo e leitura das lâminas, e análise estatística.

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002) e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Para cada bulbo de cebola analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para o controle, TE 24h e TE 48h de cada grupo tratamento em análise.

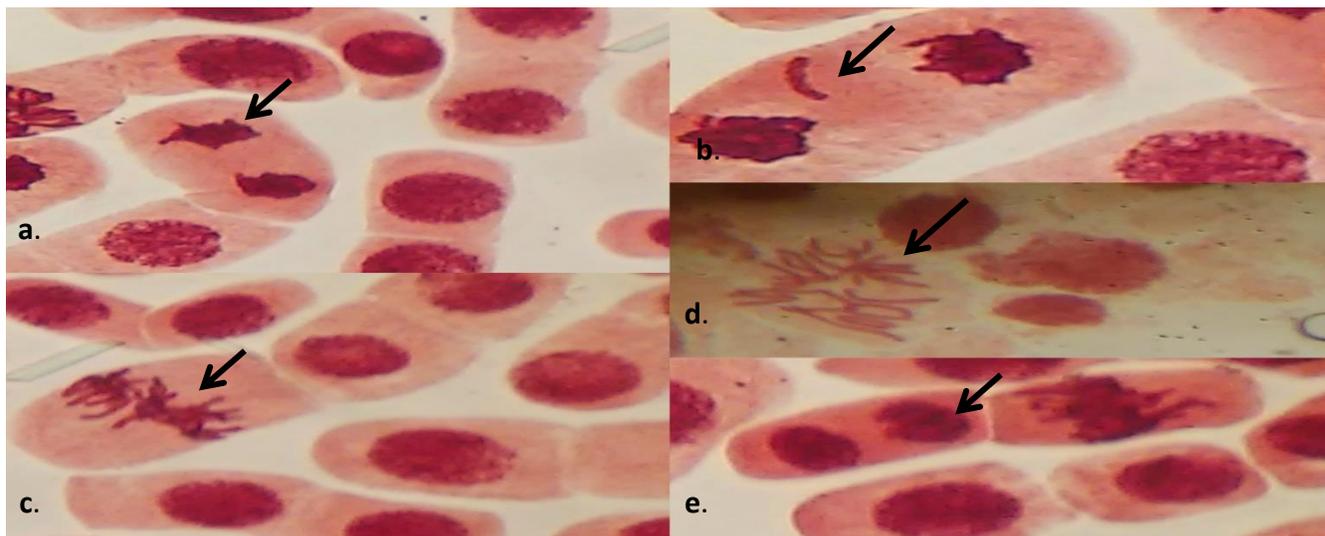
Foram observadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase (figura 3). Foi calculado o número de células em interfase e em divisão de cada controle e tempo de exposição e determinado o índice de divisão celular ou índice mitótico (IM). Avaliou-se também a ação das doses por meio do número de células micronucleadas, de metáfases colchícinicas, pontes anáfas e telofásicas, ampliações gênicas, células com aderências, brotos nucleares e anáfases multipolares. (figura 4).

Figura 3 - Principais fases da divisão mitótica.



a. Célula em interfase. **b.** célula em metáfase. **c.** célula em prófase. **d.** célula em anáfase. **e.** célula em telófase. Fonte: produção do *próprio autor*

Figura 04 – Principais alterações encontradas nos tratamentos feitos com os aromatizantes.



a. Telófase com amplificação genica. **b.** telófase com perde cromossômica. **c.** metáfase com quebra cromossômica. **d.** metáfase colchicina **e.** célula binucleada. Fonte: produção do *próprio autor*.

| | | | | | | | | |
|------------------------|-----|-------|-----|-----|-----|-----|-----|-------------------|
| | CO | 4.467 | 195 | 144 | 99 | 95 | 533 | 10,7 ^a |
| AC 0,2 / AM 0,4 | 24h | 4.914 | 43 | 17 | 18 | 08 | 86 | 1,7 ^b |
| | 48h | 4.909 | 50 | 19 | 14 | 08 | 91 | 1,8 ^b |
| | CO | 4.362 | 234 | 159 | 135 | 110 | 638 | 12,8 ^a |
| AC 0,2 / AM 0,6 | 24h | 4.724 | 52 | 19 | 11 | 14 | 96 | 1,9 ^b |
| | 48h | 4.733 | 41 | 12 | 13 | 11 | 77 | 1,5 ^b |
| | CO | 4.376 | 229 | 229 | 93 | 73 | 624 | 12,5 ^a |
| AC 0,4 / AM 0,2 | 24h | 4.727 | 148 | 99 | 19 | 07 | 273 | 5,5 ^b |
| | 48h | 4.797 | 84 | 98 | 12 | 09 | 203 | 4,1 ^b |
| | CO | 4.437 | 321 | 128 | 88 | 26 | 563 | 11,3 ^a |
| AC 0,4 / AM 0,6 | 24h | 4.903 | 59 | 22 | 08 | 08 | 97 | 1,9 ^b |
| | 48h | 4.907 | 63 | 18 | 09 | 03 | 93 | 1,9 ^b |
| | CO | 4.546 | 318 | 93 | 40 | 03 | 454 | 9,1 ^a |
| AC 0,6 / AM 0,2 | 24h | 4.807 | 94 | 58 | 22 | 19 | 193 | 3,7 ^b |
| | 48h | 4.901 | 52 | 31 | 11 | 05 | 99 | 2,0 ^b |
| | CO | 4.495 | 309 | 113 | 83 | 13 | 505 | 10,1 ^a |
| AC 0,6 / AM 0,4 | 24h | 4.938 | 32 | 14 | 13 | 03 | 62 | 1,4 ^b |
| | 48h | 4.947 | 25 | 18 | 07 | 03 | 53 | 1,0 ^b |

TCII – Total de células em interfase e indiferenciadas; TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; IM – Índice Mitótico; TCD – Total de células em divisão; AC – Aromatizante Chocolate; AM – Aromatizante Morango, / - associação. Valores de IM seguidos da mesma letra dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente entre si ao nível de 5% pelo teste χ^2 .

A partir dos resultados descritos na Tabela 01, verificou-se que os índices mitóticos obtidos para os TE 24h e TE 48h de todas as associações (tratamentos) em análise, AC 0,2/AM 0,4; AC 0,2/AM 0,6; AC 0,4/AM 0,2; AC 0,4/AM 0,6; AC 0,6/AM 0,2 e AC 0,6/AM 0,4, foram significativamente diferentes em relação aos índices de divisão celular obtidos para os seus respectivos controles, mostrando-se citotóxicos. Porém,

quando comparados os índices mitóticos dos TE 24h destes tratamentos com os seus específicos TE 48h observou-se que não foram estatisticamente diferentes entre si.

Na Tabela 2, é apresentado o número de células em interfase e das diferentes fases da divisão celular, bem como os valores de índice mitótico obtidos a partir de células de tecido meristemático de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com as soluções tratamentos provenientes da associação entre os aromatizantes de Chocolate e Leite Condensado em diferentes doses. Estas associações foram analisados nos TE 24 e TE 48 horas. Também foram apresentados os valores significativos de χ^2 .

Tabela 02 - Número de células observadas em cada fase do ciclo celular de tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com os aromatizantes alimentares sintéticos, idênticos aos naturais, de Chocolate e Leite Condensado, associados em diferentes doses, nos TE 24 e TE 48 h. As doses em estudo foram: 0,2; 0,4 e 0,6 ml.

| AROMATIZANTE DE CHOCOLATE / AROMATIZANTE DE LEITE CONDENSADO | | | | | | | | |
|---|-----------|-------------|----------|----------|----------|----------|------------|-------------------|
| Solução Tratamento - Doses associadas (ml) | TE | TCII | P | M | A | T | TCD | IM (%) |
| | CO | 4663 | 199 | 68 | 46 | 24 | 337 | 6,7 ^a |
| AC 0,2 / ALC 0,4 | 24h | 4730 | 82 | 120 | 40 | 28 | 270 | 5,4 ^a |
| | 48h | 4855 | 67 | 47 | 18 | 13 | 145 | 2,9 ^a |
| AC 0,2 / ALC 0,6 | CO | 4495 | 207 | 140 | 115 | 43 | 505 | 10,1 ^a |
| | 24h | 4469 | 213 | 144 | 119 | 45 | 531 | 10,6 ^a |
| | 48h | 4627 | 197 | 95 | 47 | 34 | 373 | 7,4 ^a |
| | CO | 4567 | 238 | 62 | 25 | 08 | 433 | 8,7 ^a |
| AC 0,4 / ALC 0,2 | 24h | 4557 | 204 | 140 | 64 | 35 | 443 | 8,9 ^a |
| | 48h | 4665 | 191 | 95 | 32 | 17 | 335 | 6,7 ^a |

| Solução Tratamento - Doses associadas (ml) | TE | TCII | P | M | A | T | TCD | IM (%) |
|---|-----------|-------------|----------|----------|----------|----------|------------|-------------------|
| | CO | 4442 | 287 | 140 | 88 | 43 | 558 | 11,1 |
| AM 0,2 / ALC 0,4 | 24h | 4854 | 92 | 90 | 58 | 26 | 216 | 4,3 |
| | 48h | 4868 | 98 | 18 | 13 | 03 | 132 | 2,6 |
| | CO | 4104 | 434 | 206 | 169 | 87 | 896 | 17,9 ^a |
| AM 0,2 / ALC 0,6 | 24h | 4841 | 155 | 64 | 30 | 10 | 259 | 5,1 ^b |
| | 48h | 4862 | 63 | 52 | 15 | 08 | 138 | 2,7 ^b |
| | CO | 4094 | 456 | 211 | 163 | 76 | 906 | 18,1 ^a |
| AM 0,4 / ALC 0,2 | 24h | 4800 | 91 | 77 | 26 | 06 | 200 | 4,0 ^b |
| | 48h | 4793 | 46 | 37 | 20 | 04 | 107 | 2,1 ^b |
| | CO | 4413 | 251 | 187 | 77 | 62 | 587 | 11,7 ^a |
| AM 0,4 / ALC 0,6 | 24h | 4925 | 28 | 20 | 16 | 11 | 75 | 1,5 ^b |
| | 48h | 4957 | 24 | 14 | 05 | 03 | 46 | 0,9 ^b |
| | CO | 4278 | 538 | 111 | 51 | 22 | 722 | 14,4 ^a |
| AM 0,6 / ALC 0,2 | 24h | 4632 | 99 | 47 | 42 | 20 | 208 | 4,1 ^b |
| | 48h | 4819 | 90 | 36 | 38 | 17 | 181 | 3,6 ^b |
| | CO | 4439 | 341 | 145 | 57 | 18 | 561 | 11,2 ^a |
| AM 0,6 / ALC 0,4 | 24h | 4887 | 56 | 26 | 15 | 16 | 113 | 2,2 ^b |
| | 48h | 4901 | 28 | 08 | 11 | 02 | 49 | 1,0 ^b |

TCII – Total de células em interfase e indiferenciadas; TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; IM – Índice Mitótico; TCD – Total de células em divisão dentro de um tratamento; AM – Aromatizante Morango, ALC – Aromatizante Leite Condensado; / - associação. Valores de IM seguidos da mesma letra dentro de um mesmo tratamento não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste χ^2 .

Verificou-se na Tabela 03, que em todos os tratamentos provenientes da associação entre os aromatizantes de Morango e Leite Condensado, AM 0,2/ALC 0,4; AM 0,2/ALC 0,6; AM 0,4/ALC 0,2; AM 0,4/ALC 0,6; AM 0,6/ALC 0,2 e AM 0,6/ALC 0,4, os índices de divisão celular dos seus TE 24h e TE 48h foram significativamente diferentes aos obtidos para os seus controles. Porém quando comparados, dentro de um mesmo tratamento, os TE 24h e 48h não diferiram entre si.

Com os resultados apresentados nas Tabelas 01, 02 e 03 pode-se sugerir que o aromatizante de Morango foi o mais citotóxico dos aditivos testados. Na tabela 01, observa-se que sempre que a dose deste aromatizante era maior que 0,2 ml, como nas associações AC 0,2/AM 0,4; AC 0,2/AM 0,6; AC 0,4/AM 0,6 e AC 0,6/AM 0,4, o índice de divisão celular foi drasticamente reduzido já no TE 24h em relação aos seus respectivos controles. Isto também foi verificado na Tabela 03, onde os tratamentos AM 0,4/ALC 0,2; AM 0,4/ALC 0,6; AM 0,6/ALC 0,2 e AM 0,6/ALC 0,4 tiveram seus índices mitóticos significativamente reduzidos no TE 24h e TE 48h quando comparados aos seus controles. Nos tratamentos onde a dose 0,2 ml do aditivo de Morango esteve associada, AC 0,4/AM 0,2 e AC 0,6/AM 0,2 (Tabela 1), e AM 0,2/ALC 0,4 e AM 0,2/ALC 0,6 (Tabela 3), a inibição significativa da divisão celular também ocorreu, porém de forma gradativa entre os dois TE. Já na Tabela 02, os tratamentos provenientes da associação entre os aromatizantes de Chocolate e Leite Condensado, também reduziram a divisão celular do tecido em análise de forma gradativa entre os TE, no entanto, esta redução não foi estatisticamente significativa.

Marques et al. (2015). analisaram individualmente os aromatizantes alimentares de Chocolate, Morango e Leite Condensado em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, utilizando as doses de 0,2; 0,4 e 0,6 ml, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, e verificaram que para o aromatizantes de Leite Condensado, somente a dose 0,6 ml inibiu significativamente o ciclo celular nos dois tempos de exposição observados. Para o de Chocolate foi verificado que a dose de 0,4 ml no tempo de exposição 48 horas, e a de 0,6 ml nos tempos de exposição de 24 e 48 horas diminuíram significativamente o índice mitótico das células do sistema *A. cepa*. Já o aditivo de Morango nas três doses e nos dois tempos de exposição estabelecidos

reduziu drasticamente a divisão celular logo no TE 24h, dado este que corrobora aos resultados obtidos aqui neste estudo de maior citotoxicidade para este aroma as células de raízes de *A. cepa* em relação aos aditivos de Chocolate e Leite Condensado. De acordo com Gomes et al. (2013), a redução de índice mitótico ocasionada por compostos químicos em células normais, sem nenhum tipo de alteração, ocasiona o mal funcionamento de um tecido em função de não permitir a reposição normal de células, alterar a expressão gênica e, conseqüentemente, resultar no mal funcionamento do órgão onde está localizado.

Nenhum dos tratamentos em associação de Chocolate/Morango, Chocolate/Leite Condensado e Morango/Leite Condensado induziram número significativo de alterações de fuso mitótico e micronúcleos, sendo portanto não genotóxicas nestas condições de estudo. Este resultado também corrobora com os dados obtidos por Marques et al.(2015) , que também não observaram alterações de fuso e nem cromossômicas em número significativo em sua pesquisa de avaliação de toxicidade em nível celular destes aromatizantes analisados individualmente. Os tipos de alterações celulares observadas com os aromatizantes em associação, foram micronúcleos, metáfase colchicínica, anáfase com ponte e telófase com ponte.

Infelizmente não se encontrou a descrição da composição química referente a estes três aromatizantes. No entanto, na literatura científica, apesar de poucos, são encontrados trabalhos de avaliação de toxicidade de alguns constituintes das classes de compostos químicos que podem compor a formulação dos aditivos de aroma e sabor em geral. Dentre os conservantes, classe que inibe o desenvolvimento microbiano em alimentos, estão o benzoato de potássio, benzoato de sódio e nitrato de potássio , compostos estes que, segundo Mpountoukas et al. (2010) e Zequin et al.(2011) , foram clastogênicos, mutagênicos e citotóxicos as células normais de sangue periférico humano. Também encontra-se o ácido bórico, ácido cítrico, citrato de potássio e citrato de sódio que, de acordo Tükoğlu (2007) , acarretaram redução significativa ao índice de divisão celular das células de meristemas de raízes de *A. cepa*, mostrando-se citotóxicos.

Para a classe de diluentes, compostos importantes por manterem a uniformidade e facilitarem a incorporação e dispersão de aromas concentrados nos produtos alimentícios, Demir; Kocaoglu; Kaya (2010) verificaram que álcool benzoico em altas concentrações promoveu danos significativos ao fuso mitótico, e conseqüentemente a divisão celular em células sanguíneas humanas provenientes de sangue periférico. Já o diluente diacetil (2,3-butadiona), em ensaio de mutação gênica em linfoma de ratos, causou danos significativos ao loci do cromossomo 11 destas células, causando perda da expressão dos genes para enzima timidina-quinase neste animais . Ainda para o diluente diacetil, foi verificado que tal composto tem o potencial de substituir bases de timina por guaninas em regiões de eucromatina, também acarreta o rompimento de pontes de hidrogênio e de dissulfeto em estrutura terciária de enzimas envolvidas no processo de divisão celular.

Apesar de muito expressivos, os dados obtidos por estes pesquisadores não podem ser diretamente atribuídos aos resultados obtidos aqui para os aromatizantes de Chocolate, Morango e Leite Condensado, em função de não se ter informações de quais compostos químicos estão representando os conservantes e os diluentes na composição química destes ingredientes. É importante enfatizar que para cada uma das classes que compõem os aditivos de aroma e sabor, em média, trinta compostos químicos estão representando-as. Dentre elas, a única que possui restrição de uso de alguns de seus constituintes é a de solventes de extração, onde o ácido agárico, aloina, beta-azorona, berberina, cumarina, ácido cianídrico, hipericina, pulegona, quassina, safrol e isosafrol, santonina e tuyona alfa e beta possuem limites máximos toleráveis para comporem os aromatizantes alimentares.

Dessa forma, Konishi; Hayashi; Fukushima (2011) , alertam para a necessidade de avaliações toxicológicas das classes constituintes e/ou dos aromatizante ao qual fazem parte, para que, juntamente com as pesquisas de toxicidade em nível celular já realizadas, se possa repensar e/ou reorganizar o conteúdo presente nos documentos técnicos das agências responsáveis pela regulamentação destes aditivos alimentares. Estes autores ainda lembram que os aromatizantes alimentares Esparteína, Hexanoato de alila e Quinina foram proibidos por estes órgãos reguladores no início da

década de 80 em função dos resultados provenientes de estudos de avaliação de toxicidade aguda e a longo prazo realizados em diferentes sistemas testes.

Também é relevante mencionar que a ANVISA (2007), apesar de não citar em documento quais estudos, concentrações e compostos, e nem quais aromatizantes determinaram tal conclusão, declara em seu documento técnico sobre a regulamentação de aromatizantes que doses elevadas de tais aditivos sintéticos provocam ações irritantes e narcóticas ao organismo, podendo produzir toxicidade ao trato digestório quando utilizadas cronicamente e de maneira indiscriminada. Entretanto, Salinas (2002) e Honorato e Nascimento (2011), declaram em seus manuscritos que a utilização de aromatizantes alimentares em doses baixas não promove risco a saúde humana. Porém, quando as doses são elevadas, estes autores relatam que tais ingredientes podem provocar ações irritantes, narcóticas e toxicidade celular crônica a longo prazo, sempre que empregados em doses superiores as recomendadas. No entanto, da mesma forma que o órgão de vigilância nacional, não especificam quais doses são consideradas altas ou baixas. Também não discriminam quais aromatizantes possuem esta ação e nem quais foram os organismos de prova utilizados para a obtenção destas informações.

5 CONCLUSÃO

Todos os tratamentos em associação avaliados reduziram a divisão celular das células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, porém, não foram genotóxicos a este organismo teste. O aromatizante de Morango foi o que demonstrou maior toxicidade as células do tecido em análise.

Com os resultados obtidos neste trabalho, aliado aos já descritos na literatura científica, verifica-se que embora a utilização de aromatizantes em alimentos seja permitida por agências de vigilância alimentar em todo o mundo, torna-se necessário a análise constante do potencial tóxico destes compostos (ou de seus constituintes químicos) para, cada vez mais, se determinar, com propriedade, a real citotoxicidade destes aditivos, com ênfase aos de Chocolate, Morango e Leite Condensado, prezando sempre pelo bem-estar daqueles que os consomem. Outros sistemas testes, com animais e em culturas de células normais, também devem ser utilizados para a avaliação de toxicidade destes três aditivos de aroma e sabor.

6 REFERÊNCIAS

ACS. About the American Chemical Society. **American Chemical Society** (2010). Visitado em 11 de outubro de 2013.

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

AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALIL, J.; AGOND, R. C.; MOTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Rev. bras. alerg. imunopatol.** 2011.

BAPTISTA, P.; VENÂNCIO, A. **Os perigos para a segurança alimentar o processamento de alimentos**, 2003.

BAYNES, J.; DOMINICZAK, M. H. Bioquímica médica. 1ªed. São Paulo: **Manole**, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **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: 12 Abr, 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Aditivos Aromatizantes/Aroma**. Resolução N. 104 de 14 de maio de 1999. Disponível em: <http://www.engetecno.com.br/port/legislacao/norqual_aditivos_aromatizantes.htm>.v Acesso em: 13 Abril, 2015.

BARROS, S. B. M.; DAVINO, S. C.; Oga, S.; CAMARGO, M. M. A.; BATISTUZZO, J. A. O. Avaliação da toxicidade. **Fundamentos de Toxicologia**. São Paulo: Ed. Atheneu. p.59-70, 2008.

CARDOSO, G. H. S.; DANTAS, E.B.S.; SOUSA, F. R. C.; PERON, A. P. Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) in plant test system. **Braz J Biol.** 2014;74: 886-9. Doi: 10.1590/1519-6984.07313 33 34 13.

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;72:722-25. doi:10.1016/j.chemosphere.2008.03.0562930

CARVALHO, P. R. ADITIVOS DOS ALIMENTOS. **Revista Logos**, n. 12, 2005.

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

CODEX STAN 192-1995. Codex Alimentarius - **Codex General Standard for Food Additives** (Adopted in 1995. Revision 1997, 1999, 2001, 2003, 2004, 2005, 2006, 2007, 2008), 2008. Acessado em 03/09/2008, disponível em: http://www.codexalimentarius.net/gsfaonline/CXS_192e.pdf.

DEMIR, E.; KOCAOGLU, S.; KAYA, R. Assessment genotoxic effects of benzyl derivatives by comet assay. **Food Chem Toxicol.**;48:1239-42, 2010. doi:10.1016/j.fct.2010.02.016212222.

DOÑBAK, L.; RENCU-ZOGULLARI, E.; TOPAKTAS, M. **The cytogenetic effects of the food additive boric acid in *Allium cepa* L.** Cytologia 67, 153–157, 2002.

FENG, J.; CERNIGLIA, C. E.; CHEN, H. Toxicological significance of azo dye metabolism by human intestinal microbiota. **Front Biosci** (Elite Ed.), 4:568-586, 2010.

FISKJÖ, G. *Allium cepa* teste I: A 2-3 day plant teste for toxicity assessment by measuring the mean root growth of onions (*Allium cepa* L.) **Environmental Toxicology and water Quality**, Nova lorque, v. 8, n. 4, p. 461- 470, 1993.

GADANO, A.; GURNI, A.; LÓPEZ, P.; FERRARO, G.; CARBALLO, M. In vitro genotoxic evulation of the medicinal plant *Chenopodium ambrosioides*. **L. J ethonopharmacol** 81: 11- 16, 2002.

GOMES, K. M.; OLIVEIRA, M. V. G. A.; CARVALHO, F. R. S.; MENEZES, C. C.; PERON, A. P. Citotoxicity of food dyes sunset yellow (E-110), bordeaux red (E-123), and tatrazine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 33, p. 218-223, 2013. doi:10.1590/S0101-20612013005000012910

GOUVEIA, F. Industria de alimentos: no caminho da inovação de produtos novos. **Inovação Unimep**, v.2,n.5,p.32-37, 2006.

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

GULTEKIN. F.; DOGUC, D. K.; KULAC, E. Effects of maternally exposed coloring food additives on receptor expressions related to learning and memory in rats. **Food Chem Toxicol.** 2013;56:145-48. doi: 10.1016/j.fct.2013.02.016

HERA. **Health, Empowerment, Rights and Accountability**. New York: IWHC, 2006. Disponível em: . Acesso em: 21 abr. 2015

HERRERO, O.; MARTÍN, J. P.; FREIRE, P. F.; LÓPEZ, L. C.; PEROPADRE, A.; HAZEN, M. J. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. **Mut Res.** 2012, 743:24-34. doi:10.1016/j.mrgentox.2011.12.0282122

HONORATO, T. C.; NASCIMENTO, K. D. O. Consumer Knowledge about additives used in the production and conservation of food. **Nut Brasil.** 10:42-48, 2011. (in Portuguese)

HONORATO, T. C.; SILVA, E. B. D.; PEREIRA, T. P.; NASCIMENTO, K. D. O. D. Food Additives: applications and Toxicology. **Rev Verde.** 8:01-11, 2014. (in Portuguese)

IBGE-**Brazilian Institute of Geograpy and Statistics**. Family Bugdet Survey 2008-2009. 1st ed. Rio de Janeiro (RJ) Brazil, 2010.

JECFA. **Evaluation of certain food additives**. Fifty-ninth Report of the Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives. WHO Technical Report Series, No. 913, , 2002. http://www.who.int/pcs/jecfa/JECFA_publications.htm.

KENEKT, P.; Jarvinen, R.; Dich, J.; Hakulinen, T. Risk of colorectal and other gastrointestinal cancers after exposure to nitrate, nitrite ans N-nitroso compounds: A follow-up study. **Internacional Journal of Cancer** 80(6):852-856, 1999.

KONISHI, Y.; HAYASHI, S. M.; FUKUSHIMA, S. Regulatory forum opinion piece*: supporting the need for international harmonization of safety assessments for food flavoring substance. **Toxicol Pathol.** 42:949-53, 2011. Doi: 10.1177/0192623313495603 17 18.

KURASÍ, M.; NOWAKOWSKA, J.; SLIWIŃSKA, E.; PILARSKI, R.; ILASZ, R.; TYKARSKA, T.; ZOBEL, A.; GULEWICZ K. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium* test induced by bark water extract of *Uncaria tomentosa* (Willd.) DC. **Journal Ethnopharmacol**, v. 107, n. 2, p. 211–221, 2006.

LACERDA, L. P.; MALAQUIAS, G.; PERON, A. P. Antiproliferative action of aqueous extracts of *Hymenaea stigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **An Acad Bras Cienc.** 86:1147-50, 2014. Doi: 10.1590/0001-37652014201301632526

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, n. 1, p. 71–81, 2009; 682:71-81. doi:10.1016/j.mrrev.2009.06.002414215.

LERNER, C. A.; SUNDAR, I. K.; YAO, H.; GERLOFF, J.; OSSIP, D. J.; MCINTOSH, S.; ROBINSON, R.; RAHMAN, I. Vapors produced by electronic cigarettes and e-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. *6:10*, 2015. doi: 10.1371/journal.pone.01167322627

LEVAN, A. The effect of colchicine on root mitoses in *Allium*. **Hereditas, Lund**, v. 24, n. 4 p. 471-486, 1938. Disponível em: . Acesso em: 11 fev. 2012.

LIMA, G. F. **Aditivos alimentares: definições, tecnologia e reações adversas**. Veredas Revista Eletrônica de Ciências, v. 4, n. 2, p. 101-107, 2011.

MARMITT, S.; PIROTTA, L. V.; STULP, S. Aplicação de fotólise direta e UV/H₂O₂ a efluente sintético contendo diferentes corantes alimentícios. **Química Nova**, v. 33, n.2, p. 384-388, 2010.

MARQUES, G. S.; SILVA, S. I. O.; SOUSA, J. M. C.; FERREIRA, P. M. P.; PERON, A. P. Cytotoxicity and mutagenic potential of liquid synthetic food flavoring evaluated individually and in association. **Cienc Tecnol Aliment**. 2015; 35: 183-88. Doi: 10.1590/1678-457x.6596

MONARCA., S.; FERETTI, D.; COLLIVIGNARELLI, C.; GUZZELA, L.; ZERBINI, I.; BERTANZA, G. E.; PEDRAZZANI, R. The influence of different disinfectants on mutagenicity and toxicity of urban wastewater. **Water Research**, Londres, v. 34, n.17, p. 4261-4269, 2000.

MOODIE, R.; STUCKLER, D.; MONTEIRO, C.; SHERON, N.; NEAL, B.; THAMARANGSI, T. Profits and pandemics: prevention of harmful effects of tobacco, alcohol, and ultra-processed food and drink industries. **Lancet**, 2013;381:670-79. doi: 10.1016/S0140-6736(12)62089-33031

MORE, S. S.; RAZA, A.; VINCE, R. The butter flavorant, diacetyl, forms a covalent adduct with 2-deoxyguanosine, uncoils DNA, and leads to cell death. **J. Agric. Food Chem**. 2012;60:3311-17, 2012. doi:10.1021/jf300180e303124.

MPOUNTOUKAS, P.; PANTAZAKI, A.; KOSTARELI, E.; CHRISTODOULOU, P.; KARELI, D.; POLILIOU, S.; LIALIARIS, T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food Chem Toxicol**. 48:2934-44, 2010. doi:10.1016/fct.2010.07.030 111219

NEVES, E. S.; FERREIRA, P. M. P.; LIMA, L. H. G. M.; PERON, A. P. Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L. **An Acad Bras Cienc.** 86:1131-31, 2014. Doi: 10.1590/0001-373765201420130170 38 3914.

NJAGI, G. D. E.; GOPALAN, H. N. B. Cytogenetic effects of the food preservatives-sodium benzoate and sodium sulphite on *Vicia faba* root meristems. **Mutat. Res.** 102, 213–219, 1982.

OLIVEIRA, M. V. A.; ALVES, D. D. L.; LIMA, L. H. G. M.; SOUSA, J. M. C.; PERON, A. P. Citotoxicidade dos corantes alimentares erythrosine (E-127), azul brilhante (E-133) e red 40 (E-129) em sistema-teste vegetal. **Acta Scientiarum Biological Science**, v. 35, p. 557-562, 2013. Doi: 10.4025/actascibiols.v35i4.1841945

PIERCE, J.S.; ABELMANN, A.; SPICER, L. J.; ADAMS, R. E.; FINLEY, B.L. Diacetyl and 2,3-pentanedione exposures associated with cigarette smoking: implications for risk assessment of food and flavoring workers. **Crit Rev Toxicol.** 2014;44:420-35. doi: 10.3109/10408444.2014.8822923536

POLONIO, M. L. T.; PERES, F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. **Cadernos de Saúde Pública**, v.25, n.8, p. 1653-1666, 2009.

RABELLO-GAY, M. N. Genetic Toxicológica: Bases e Metas. **Instituto Butantan**, São Paulo, 1991.

RIBEIRO, L. R.; SALVADORI, D. M. F.; MARQUES, E. K. **Mutagênese Ambiental**. Editora Ulbra. Canoas, 1ª ed., 2003.

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

SANSEVERINO, M. T. V.; SPRITZER, D. T.; FACCINI, L. S. **Manual de teratogênese**. 1ª ed. Porto Alegre: Editora Universitária/UFRGS, 2001.

SASAKI, Y. F.; KAWAGUCHI, S.; KAMAYA, A.; OHSHITA, M.; KABASAWA, K.; IWAMA, K.; TANIGUCHI, K.; TSUDA, S. The comet assay with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. **Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis**. v.519, p.103-119, 2002.

SILVA, J.; FONSECA, M. B.; SILVA, J.; ERDTMANN, B.; HENRIQUES, J. A. P. **Estudos Toxicológicos no Ambiente e na Saúde Humana**, In: Genética Toxicológica, (Orgs.), pp. 69-84, Alcance, Porto Alegre, 2003.

SUGIMURA T.1982. Mutagens, carcinogens, and tumor promoters in our daily food. *Cancer*. 49(10): 1750-1984. **Tecnol. & Ciên. Agropec.**, João Pessoa, v.6, n. 1, p. 33-38, mar. 2012.

TABREZ, S.; SAHKIL, S.; UROOJ, M.; DAMANHORI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; AHMAD, D. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an over view of the techniques and their efficacies. **J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev**, 29:250-75, 2011. doi:10.1080/10590501.2011.601849464716.

TEIXEIRA, R. O.; CAMPAROTO, M. L.; MANTOVANI, M. S.; VICENTINI, V. E. P. Assessment of two medicinal plants, *Psidium guajava* L. and *Achillea millefolium* L., in in vitro and in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 551-555.

TONETTO, A.; HUANG, A.; YOKO, J.; GONÇALVES, R. **O Uso de Aditivos de Cor e Sabor em Produtos Alimentícios**. 2008. 21 f. Texto de apoio (Especialização em Atividade Física Adaptada e Saúde) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

TORRES, E. A. F. S.; MACHADO, F. M. S. **Alimentos em questão: uma abordagem técnica para as dúvidas mais comuns**. São Paulo: Ponto Crítico, 2001.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mut Res.**;626:4-14, 2007. doi:10.1016/j.margentox.2016.07.006 18 19 21.

VALSECHI, O. A. **Aditivos**. Universidade Federal de São Carlos Centro de Ciências Agrárias. São Paulo, Araras, 2001.

VICENTINI, V. E. P. et al. A verrhoa 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.

WHITTAKER, P.; CLARKE, J.J.; SAN, R. H.; BEGLEY, T. H.; DUNKEL, V. C. Evaluation of the butter flavoring chemical diacetyl and a fluorochemical paper additive for mutagenicity and 24 toxicity using the mammalian cell gene mutation assay in L5178Y mouse lymphoma cells. **Food Chem Toxicol**. 2008;46:2928-33. doi:10.1016/j.fct.2008.06.001 262723.

WU, L.; ZHANG, Q.; SHAN, L.; CHEN, Z. Identifying critical factors influencing the use of additives by food enterprises in China. **Food Control**, v.31, n.2, p.425-432, june, 2013.

ZEQUIN, N.; YÜZBAŞIOĞLU, D.; UNAL, F.; YILMAZ, S.; AKSOY, H. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. **Food Chem Toxicol**, 49:763-69, 2011. doi: 101016/j.fct.2010.11.040151620.



**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
() Dissertação
(x) Monografia
() Artigo

Eu, Sara Selanda Oliveira da Silva,
autorizo com base na Lei Federal nº 9.610 de 19 de Fevereiro de 1998 e na Lei nº 10.973 de
02 de dezembro de 2004, a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar,
gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação
Toxicidade em nível Celular de Aromatizantes Alimen-
tares sintéticos avaliados associados entre si em diferentes doses
de minha autoria, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, pela internet a título
de divulgação da produção científica gerada pela Universidade.

Picos-PI 11 de Janeiro de 2016.

Sara Selanda Oliveira da Silva
Assinatura

[Assinatura]
Assinatura