



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

ILA MONIZE SOUSA SALES

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DA TOXICIDADE DE ADITIVOS AROMATIZANTES
SINTÉTICOS ARTIFICIAIS**

PICOS, PIAUÍ

2016

ILA MONIZE SOUSA SALES

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DA TOXICIDADE DE ADITIVOS AROMATIZANTES
SINTÉTICOS ARTIFICIAIS**

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

2016

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca José Albano de Macêdo

S163a Sales, Ila Monize Sousa.

Análise citogenética da toxicidade de aditivos aromatizantes sintéticos artificiais / Ila Monize Sousa Sales – 2016.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (38 f.)

Monografia (Licenciatura em Ciências Biológicas)- Universidade Federal do Piauí, Picos, 2016.

Orientadora: Profª. Dra. Ana Paula Peron

1. Divisão Celular. 2. Aromatizantes Alimentares.
3. Citogenética-Genotoxicidade. I. Título.

CDD 581.87

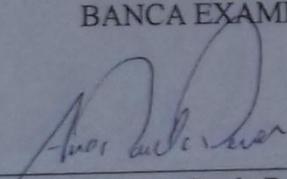
ILA MONIZE SOUSA SALES

**ANÁLISE CITOGENÉTICA DA TOXICIDADE DE ADITIVOS AROMATIZANTES
SINTÉTICOS ARTIFICIAIS**

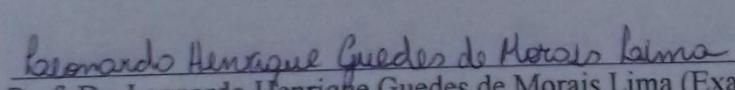
Monografia apresentada ao curso de Ciências
Biológicas da Universidade Federal do Piauí,
Campus Senador Helvídio Nunes de Barros,
como requisito parcial para a obtenção do grau de
Licenciado em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 08 / 03 / 2016

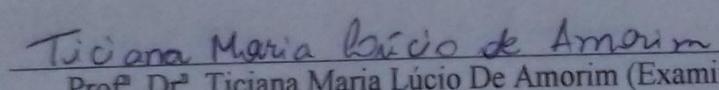
BANCA EXAMINADORA



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



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



Prof. Dr.ª Ticiania Maria Lúcio De Amorim (Examinador)
Curso de Medicina – UFPI

A minha família, e em especial aos meus pais que sempre me incentivaram a colocar os estudos acima de tudo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por ter me dado o dom da vida, e por ter permitido que eu chegasse até aqui. A minha família, minha base, que sempre me incentivou e me apoiou durante todo tempo em especial aos meus pais, Francisco Gilcemar e Maria do Socorro, que deram todo suporte financeiro e emocional que precisei durante todo o decorrer do curso. E ao meu irmão, Egon Victor, que mesmo com todas as diferenças sempre esteve presente.

À Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Peron, minha eterna gratidão e respeito. Muito Obrigado pela orientação profissional e pessoal, são inúmeros adjetivos para destacar o que você contribuiu para que este trabalho fosse concluído. Obrigado por toda confiança, amizade, educação, paciência, companheirismo, fidelidade enfim por tudo, você é admirável e amável. E muito obrigado pela adoção, por ser a minha mãe acadêmica, você é um presente de Deus.

As minhas companheiras de apartamento, Marina Carvalho, Ramone e Maura que se tornaram minha segunda família, que acompanharam de perto todas as alegrias, tristezas, decepções, que suportaram estresse e desabafos. Obrigado por cada risada, cada momento de descontração, por toda amizade.

Aos meus amigos da universidade em especial a Ellifran Dantas que foi meu anjo da guarda, me incentivou a crescer cada vez mais, que brigou quando necessário e que se fez irmão em uma grande etapa. E também a pessoas que tornaram minha vida mais fácil e a vocês agradeço Fabelina Karollyne, Erick Leal, Rayssa Aléxia, Gêysa Janne, Francisca Daniela, Cássia Dolores e Demerval Junior.

Aos meus vizinhos que se tornaram uma grande família Borges compartilhando diversos momentos, as amizades, cumplicidades e as confraternizações. Cada momento está eternizado obrigado a vocês por cada palhaçada Eugênia Feitosa, Vinícius Cruz, Marcos Vinícios, Pedro Henrique, Jackson, Helio Mauro, Hellysson, Junior e Eduardo.

Aos meus amigos irmãos que a vida me presenteou, eles trazem paz, amor, confiança e todos os sentimentos bons, á vocês Ismaille Sousa, Alisson Bruno, Alana Raiza e Iara Rege muito obrigado.

Aos mestres pelos ensinamentos repassados, as dúvidas esclarecidas, pela amizade e paciência. Em especial aos professores Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima, Sergio Bitencourt Araujo Barros, Maria do Socorro Meireles de Deus e Patrícia da Cunha Gonzaga.

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

“A coisa mais bela que podemos experimentar é o mistério. Essa e a fonte de toda a arte e ciências verdadeiras.”

(Albert Einstein)

RESUMO

Objetivou-se neste trabalho avaliara citotoxicidade e a genotoxicidade de aditivos aromatizantes dos tipos sintéticos artificiais de Biscoito e Tutti-frutti. Essa avaliação se deu por meio das células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L., nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, onde estas substâncias foram analisadas individualmente, nas doses de 0,3; 0,6 e 1,2 ml, e associadas entre si, da seguinte forma: 0,3 ml + 0,3 ml; 0,6 ml + 0,6 ml e 1,2 ml + 1,2 ml. Após os tratamentos, os meristemas de raízes foram fixados, hidrolisados e corados, e em seguida analisados em microscópio óptico, no qual se avaliou para cada dose e tratamento associado um total de 5.000 células. A partir dos resultados obtidos verificou-se que as três doses do aromatizante de Biscoito e os tratamentos em associação inibiram de forma significativa a divisão celular dos tecidos em estudo. Já as doses de Tutti-frutti não alteraram o índice de divisão celular das raízes em questão. Verificou-se também que as doses dos dois aromatizantes, bem como os tratamentos em associação, induziram aberrações celulares em número significativo ao sistema *A. cepa*. Portanto, nestas condições de análise, o aditivo de Biscoito e as doses associadas foram citotóxicos e genotóxicos, e o de Tutti-frutti, apesar de não citotóxico, teve ação genotóxica.

PALAVRAS-CHAVE: aromatizantes alimentares, divisão celular, aberrações celulares, citotoxicidade, genotoxicidade.

ABSTRACT

The goal of the present study was to evaluate the cytotoxicity and genotoxicity of artificial synthetic flavoring agents Cookie and Tutti-frutti. To this end, root meristem cells of *Allium cepa* L., were exposed to these substances in exposure times of 24 and 48 hours using individual doses of 0.3; 0.6 and 1.2 mL and doses combined as follows: 0.3 mL + 0.3 mL; 0.6 mL and 1.2 mL + 0.6 mL + 1.2 mL. After applying the treatments, root meristems were fixed, hydrolyzed, stained and analyzed a total of 5,000 cells using an optical microscope to evaluate each dose and combined treatment. All three doses of Cookie flavoring and combined treatments significantly inhibited cell division of the tissue studied. Doses of Tutti-Frutti caused no change in cell division rate. In addition, doses of both flavorings and treatments combining these solutions induced cell aberrations in a significant number of cells to the *A. cepa* system. Therefore, under these analytical conditions, Cookie flavoring and combined doses were cytotoxic and genotoxic, and Tutti-Frutti flavoring, although non-cytotoxic, demonstrated genotoxic action.

KEY WORDS: flavorings, cell division, cell aberrations, cytotoxicity, genotoxicity.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Classe de Aditivos Alimentares.....	15
Figura 1 – Aromatizantes utilizados.....	21
Quadro 2 – Doses individuais em <i>Allium cepa</i> L.....	22
Quadro 3 – Doses individuais em <i>Allium cepa</i> L.....	22
Figura 2 – Bulbos de <i>Allium cepa</i> L. em frascos com água destilada.....	23
Figura 3 – Principais fases da divisão mitótica.....	24
Figura 4 - Principais alterações encontradas nos tratamentos feitos com aromatizantes...	25

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 - Número de células observadas para cada fase do ciclo celular em tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratados com água e com os aromatizantes alimentares sintéticos artificiais de Biscoito e Tutti-frutti, nas doses de 0,3; 0,6 e 1,2 ml, avaliados individualmente e em associação, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas.....26

Tabela 02 – Número e tipos de aberrações celulares observadas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. tratadas com água e com aromatizantes alimentares sintéticos de Biscoito e Tutti-frutti, nas doses de 0,3; 0,6 e 1,2 ml, individualmente e em associação, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas.....29

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
2.1 ADITIVOS ALIMENTARES.....	14
2.2 AROMATIZANTES.....	16
2.3 TOXICOLOGIA GENÉTICA.....	18
2.4 SISTEMA TESTE.....	19
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 OBTENÇÃO DOS AROMATIZANTES ALIMENTARES.....	21
3.2 DEFINIÇÕES DAS DOSES.....	22
3.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DE A. CEPA PARA ANÁLISE CITOGENÉTICA.....	22
3.4 PREPARO E LEITURA DAS LÂMINAS, E ANÁLISE DE DADOS.....	24
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	26
5. CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS.....	34

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). Dentre os aditivos de maior importância estão os aromatizantes, substâncias com propriedades aromáticas e sápidas capazes de conferirem e/ou intensificarem o aroma e o sabor dos alimentos, sem o propósito de nutrir (BRASIL, 2007; KOCA et al., 2015). Classificados no setor alimentício como naturais, sintéticos idênticos aos naturais e sintéticos artificiais, os microingredientes de aroma e sabor possuem formulação complexa, constituída por uma variedade de compostos químicos, como diluentes, antioxidantes, antiespumantes, conservantes, emulsificantes, estabilizantes, reguladores de acidez, realçadores de sabor, antieméticos, antiaglutinantes, corantes, e solventes de extração e processamento. Em âmbito mundial, as substâncias aromatizantes são regulamentadas e autorizadas para uso pela Food and Agriculture Organization (FAO) (XU et al., 2015), e no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) através da Resolução RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007. (BRASIL, 2007).

Apesar de conferirem propriedades organolépticas essenciais aos alimentos industrializados, os aditivos aromatizantes são considerados um avanço polêmico da área de ciência e tecnologia de alimentos por muitos profissionais da área da saúde (KONISHI et al., 2011; MARQUES et al., 2015). Especialistas relatam que estes ingredientes contribuem de forma significativa para o empobrecimento da dieta, causam distúrbios severos no funcionamento do trato digestório e desencadeiam reações alérgicas e narcóticas no organismo, principalmente nas crianças e nos idosos (KONISHI et al., 2011; OLIVEIRA et al., 2013). Também salienta um fato dos órgãos de vigilância alimentar até o presente momento, não terem estabelecidos os índices de Ingestão Diária Aceitável (IDAs) para assegurarem o consumo seguro destas substâncias (ZEQUIN et al., 2011; MORE et al., 2012; MARQUES et al., 2015). Em função de tais considerações, peritos da área de segurança alimentar salientam a urgente necessidade de estudos de avaliação de toxicidade dos aromatizantes, com ênfase as avaliações de citotoxicidade, genotoxicidade e mutagenicidade (BRASIL, 1999; BRASIL, 2007; KONISHI et al., 2011; GOMES et al., 2013; MARQUES et

al., 2015; XU et al., 2015). No entanto, pesquisas sobre a toxicidade em nível celular de aditivos de aroma e sabor são praticamente inexistentes na literatura científica.

Compostos citotóxicos e/ou genotóxicos têm o potencial de alterar mecanismos celulares vitais, como a duplicação e a transcrição gênica, bem como promover alterações de fuso mitótico e quebras cromossômicas. Estas alterações podem comprometer significativamente a divisão celular do tecido ou órgão afetado e desencadear e/ou potencializar processos cancerosos (BAGATINI et al., 2007; VALAVANIDIS et al., 2013; ZILIFDAR et al., 2014). De acordo com Zaineddin et al., (2012), o desenvolvimento dos tipos mais comuns de câncer resulta da interação entre fatores endógenos e ambientais, sendo o mais notável deles a dieta alimentar, principalmente quando constituída por alimentos industrializados em demasia. Bendino et al., (2012) e Louzada et al., (2015) citam que mais de 40% dos diversos tipos de câncer são iniciados ou potencializados em razão de dietas inadequadas ricas em aditivos alimentares.

As células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. (cebola) são eficientes bioensaios para o screening inicial de toxicidade aguda em nível celular (HERRERO et al., 2011; LACERDA 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 alterações cromossômicas e de fuso mitótico (CARDOSO 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. Ainda, o sistema-teste *A. cepa* apresenta, em grande parte das vezes, similaridade satisfatória aos resultados obtidos com outros sistemas testes (TABREZ et al., 2011). Como exemplo pode-se citar os trabalhos realizados por Gomes et al., (2013) e Oliveira et al., (2013) que avaliaram em meristemas de raízes de *A. cepa* o potencial citotóxico e genotóxico de corantes alimentares dos tipos sintéticos artificiais e obtiveram resultados semelhantes aos observados em sistemas testes animais e em culturas de células.

Com base no contexto abordado, objetivou-se neste trabalho avaliar, em meristemas de raízes de *A. cepa*, individualmente e associados entre si, a citotoxicidade e a genotoxicidade de dois aromatizantes alimentares sintéticos artificiais, de Tutti-frutti, presentes em balas, chicletes, gomas, sorvetes, gelatina e refrigerantes, e de Biscoito, encontrado em massas para bolos e em biscoitos industrializados. Tais aditivos também são comumente encontrados em associação em *cupcakes* e bolos industrializados.

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 ADITIVOS ALIMENTARES

No passado, os alimentos eram fabricados e produzidos na mesma região ou regiões próximas àquelas de comercialização. A necessidade de se preservar os alimentos é antiga, não é de hoje que os aditivos alimentares vêm sendo utilizados e já estão presentes na dieta humana há muito tempo. Atualmente, com a união dos mercados em níveis nacionais e internacionais resultantes do avanço da tecnologia e da globalização, grande parte dos alimentos provenientes de regiões longínquas necessita frequentemente de aditivos e conservantes para sua integridade. Ao mesmo tempo as modificações dos hábitos alimentares da população que tem substituído gradativamente os alimentos in natura por um padrão alimentar ocidentalizado composto por alimentos industrializados ricos nos mais diversos tipos de aditivos. (AISSA, 2010; FERREIRA, 2015; AUN et al., 2011)

Aditivo alimentar é qualquer ingrediente adicionado aos alimentos intencionalmente, sem o propósito de nutrir, com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais do alimento (ALBUQUERQUE et al., 2012). Segundo Gouveia (2006) as grandes inovações estão ocorrendo principalmente na área de formulação de ingredientes e aditivos, onde o mercado brasileiro fatura anualmente entre R\$ 1,5 bilhão e R\$ 2 bilhões. Esses microingredientes se tornaram virtualmente obrigatórios na alimentação moderna, sobretudo por sua capacidade de manter a qualidade e a validade dos alimentos vendidos em supermercados.

Os microingredientes exercem um papel importante na produção de alimentos, seja para sua conservação e/ou melhorar suas características de cor, sabor, textura e aroma, e estão sendo frequentemente inseridos na alimentação precocemente de forma demasiada. É evidente a importância desses ingredientes sob o ponto de vista tecnológico, porém, é necessário estar prudente aos possíveis riscos toxicológicos que podem ser ocasionados pela ingestão comumente dessas substâncias principalmente pelo público infantil. (FERREIRA, 2015; TONETTO et al., 2008)

Os ingredientes, de maneira geral, antes de serem liberados para consumo, são avaliados individualmente quanto a sua necessidade tecnológica e segurança, assim como é recomendado que seja necessário que cada país verifique periodicamente a quantidade do consumo total desses ingredientes, para certificar-se que a ingestão total do aditivo adicionado

intencionalmente não ultrapasse as recomendações de ingestão diária aceitável. (BESSONOV et al., 2011; GANESSAN et al., 2011; LIMA, 2011). Segundo Albuquerque et al., (2012) nos rótulos dos produtos são indicados quais os aditivos alimentares presentes, mas não possuem informação dos seus efeitos na saúde humana, não possibilitando ao consumidor mais preocupado com seu bem-estar, escolher alternativas mais saudáveis.

Atualmente há cerca de 25 mil aditivos alimentares sendo utilizados em todo o mundo. Sendo que a maioria dos estudos tem afirmado que o consumo de quantidades excessivas desses microingredientes pode causar reações adversas. Justamente por estas razões, o JECFA que é o comitê científico internacional de especialistas em aditivos alimentares, administrado pela Organização Mundial da Saúde – OMS – e da Organização para Alimentação e Agricultura – FAO, tem se reunido anualmente desde 1956 para avaliar a segurança dos aditivos alimentares, atualizar e estabelecer as normas de segurança dos aditivos (HONORATO et al., 2013).

De acordo com Salinas (2002), os aditivos alimentares desempenham variadas funções destacando-se principalmente as do quadro abaixo:

Quadro 01 – Classes de Aditivos Alimentares.

TIPO	FUNÇÃO
Antiespumante	Previne ou reduz a formação de espumas.
Antiumectante/antiaglutinante	São capazes de reduzir características higroscópicas de alimentos e diminuir a tendência das partículas individuais a aderir umas as outras.
Antioxidante	Retarda o aparecimento de alteração oxidativa do alimento.
Corante	Confere, intensifica ou restaura a cor do alimento.
Conservante	Impede ou retarda a alteração dos alimentos provocada por microorganismos e enzimas.
Edulcorante	É diferente dos açúcares que dão sabor doce aos alimentos.
Espessante	Aumenta a viscosidade dos alimentos.
Gelificante	Dá textura através da formação de gel.
Estabilizante	Manutenção de dispersão uniforme de duas ou mais substâncias imiscíveis em um alimento.
Aromatizante/flavorizante	Substância ou mistura com propriedades aromáticas, sápidas ou ambas, capazes de dar ou reforçar o aroma, o sabor ou ambos dos alimentos

Umectante	Protege os alimentos da perda de umidade em ambiente de baixa umidade relativa ou que facilitam a dissolução de um pó em meio aquoso.
Regulador da acidez	Altera ou controla a acidez ou alcalinidade dos alimentos.
Emulsionante/emulsificante	Tornam possível a formação ou manutenção de uma mistura uniforme de duas ou mais fases imiscíveis no alimento.
Melhoradores da farinha	São substâncias que ser adicionadas a farinha, melhoram sua qualidade tecnológica.
Ressaltante de sabor	Ressalta e realça o sabor e/ou aroma de um alimento
Fermentos químicos	São substâncias ou misturas de substâncias que liberam gás e desta maneira, aumentam o volume de massa.
Abrilhantadores	Substâncias que quando aplicadas na superfície do alimento proporcionam aparência brilhante ou dão revestimento protetor.
Agente de firmeza ou endurecedor ou texturizante	Tornam ou mantém os tecidos de frutas ou hortaliças firmes e crocantes, ou interagem com agentes gelificantes para produzir ou fortalecer o gel.
Sequestrante	Complexos químicos com íons metálicos.
Espumantes	Possibilitam a formação ou manutenção da dispersão uniforme de uma fase gasosa em um alimento líquido ou sólido.

Fonte: Salinas, 2002.

2.2 AROMATIZANTES

Os aromatizantes são substâncias ou misturas de substâncias com propriedades odoríferas e ou sápidas, capazes de verificar ou intensificar o aroma e ou sabor dos alimentos, aproximando ao máximo dos produtos naturais, aumentando assim a aceitação pelos consumidores. São de grande importância por fornecerem a partir das propriedades sensoriais as características de cada sabor e aroma dos mais diversos produtos e alimentos industrializados. (MELLO et al., 2004; MAGALI, 2006; BRASIL, 2007).

Os aromatizantes podem ser classificados como: natural, sintético idêntico ao natural, sintético artificial, de reação ou transformação. Aromatizantes naturais são os obtidos exclusivamente por métodos físicos, microbiológicos ou enzimáticos, a partir de matérias-primas aromatizantes naturais. Aromatizantes sintéticos são os compostos quimicamente definidos obtidos por processos químicos. (BRASIL, 2007; HONORATO et al., 2013)

De acordo com a Anvisa (2007), os aromatizantes sintéticos compreendem: os aromatizantes idênticos ao natural, que são as substâncias quimicamente definidas obtidas por, e aquelas isoladas por processos químicos a partir de matérias primas de origem animal, vegetal ou microbiana que apresentam uma estrutura química idêntica a natural. E os aromatizantes artificiais são os compostos químicos obtidos por síntese, que ainda não tenham sido identificados em produtos de origem animal, vegetal ou microbiana, utilizados em seu estado primário ou preparados para o consumo humano.

Quanto à constituição dos aromatizantes possuem uma formulação química complexa, podendo ser resultado da combinação de duzentas a trezentas moléculas de substâncias diferentes. Aroma é a parte volátil, ou seja, os gases que se desprendem dos alimentos sólidos ou líquidos, sentidos pelo nosso nariz, e por conta desse fato 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 (CARVALHO, 2005; CHEESEMAN, 2012).

Segundo Gouveia (2006), a indústria de aromas é a mais representativa do segmento em faturamento, uma vez que se deseja cada vez mais reduzir o tempo gasto com o preparo de refeições com os alimentos semiprontos, entrando assim os insumos da indústria química de ingredientes, com destaque para a indústria de aromas.

Em âmbito mundial, o controle para a utilização de aditivos alimentares baseia-se na Ingestão Diária Aceitável (IDA) expressa em miligrama por quilo de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável à saúde, à luz dos conhecimentos científicos disponíveis na época da avaliação realizada pelo JECFA com base em estudos toxicológicos. Que quanto ao uso de aromatizantes alimentares autoriza este aditivo com limite *quantum satis* (q.s.), ou seja, quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico desejado, desde que não alterem a identidade e a genuinidade do alimento (BRASIL, 2010).

No Brasil a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) 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. Nos Regulamentos Técnicos são consideradas somente as funções listadas nas especificações publicadas pelo Joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives – JECFA (Comitê FAO/OMS de Especialistas em Aditivos Alimentares) (BRASIL, 2010). E diz que os

aromatizantes autorizados são aqueles constantes da lista de base ou de referência, que é a relação de todos os componentes aromatizantes com uso aprovado no mínimo, por uma das entidades: JECFA, UE (CoE), FDA ou FEMA, salvo proibições explícitas. (BRASIL, 2007).

Segundo os dados do IBGE (2010) há um aumento no consumo de produtos industrializados de alimentos e uma diminuição consumo de alimentos caseiros, o que gera um maior consumo de aditivos e uma maior preocupação por pesquisadores da área da saúde. Devido a 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).

2.3 TOXICOLOGIA GENÉTICA

Atualmente os estudos capazes de identificar substâncias potencialmente mutagênicas fazem-se muito necessários na atualidade, uma vez que o homem está exposto a um número crescente de agentes químicos e físicos que podem constituir um risco à sua saúde. Estes agentes presentes no ambiente podem agredir o material genético, resultando em mutações e até mesmo alterações correlacionadas, como oncogênese. A vulnerabilidade do material genético a agressões impostas pelo ambiente fez com que surgisse uma nova área de pesquisa - a genética toxicológica. Esta é uma das áreas da ciência que tem se dedicado à pesquisa das propriedades mutagênicas e antimutagênicas desses produtos, fazendo uso de diversos sistemas de testes. Uma das propriedades da genética toxicológica é que a molécula alvo, o DNA, quando atingida por um agente genotóxico, torna-se uma testemunha, uma prova circunstancial, do efeito genotóxico testado. Entende-se genotoxicidade como qualquer dano causado à molécula de DNA. (ANDRADE, 2007).

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; SALVADORI; MARQUES, 2003). Entretanto, a curto prazo e do ponto de vista de um único organismo, a alteração genética é quase sempre prejudicial, especialmente em organismos multicelulares, nos quais a alteração genética está mais inclinada a perturbar o desenvolvimento e a fisiologia extremamente complexos e, finalmente, sintonizados, de um organismo (ALBERTS et al., 2002).

A preservação do meio ambiente e a prevenção dos efeitos danosos causados pelo seu uso não apropriado são preocupações cada vez maiores no mundo atual. A utilização cada vez mais acentuada de produtos como fármacos, agroquímicos, cosméticos, corantes e muitos outros, tem demonstrado aumento nas taxas de mutagênese ambiental (RIBEIRO; SALVADORI; MARQUES, 2003). Tais agentes mutagênicos invadem a célula e se dirigem ao núcleo causando alterações no material genético podendo desregular o ciclo celular, fazendo com que a célula se reproduza descontroladamente invadindo tecidos adjacentes, dando início à formação de tumores.

2.4 SISTEMA TESTE

Segundo Leme; Marin- Morales, (2009) 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. (HERRERO et al., 2012)

A utilização do bioindicador *Allium cepa* (cebola) para testes de citotoxicidade foi validado por muitos pesquisadores que realizaram de forma conjunta testes em animais in vivo, obtendo resultados similares (VICENTINI et al., 2001; TEIXEIRA et al., 2003), propiciando informações valiosas para a saúde humana. E 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).

O teste *A. cepa* tem sido amplamente utilizada por conta da facilidade que este sistema teste possui para preparação e análise, pois contém células meristemáticas em constante divisão, tem cromossomos grandes e em número baixo (16 cromossomos), além de ser facilmente corados e observados, permitindo a análise das alterações cromossômicas e os 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. (SILVA et al., 2003; KURÁS et al., 2006).

Esse bioensaio é considerado uma das abordagens mais eficientes e é rotineiramente usado para determinar os efeitos tóxicos de compostos químicos no ambiente (LEME; MARIN-MORALES, 2009). Estudos com corantes alimentares realizados por Oliveira et al., (2013) e Gomes et al., (2013) demonstra que os resultados de teste de toxicidade utilizando a espécie *A. cepa* ressaltam 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.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Animal (NUPBSAM) do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí, Município de Picos, Estado do Piauí, no período de dezembro de 2014 a outubro de 2015.

3.1 OBTENÇÃO DOS AROMATIZANTES ALIMENTARES

Os aromatizantes alimentares sintéticos doces e líquidos, artificiais, de sabores tutti-frutti e biscoito foram adquiridos de uma revendedora especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos localizados na região Nordeste do Brasil. Os aromatizantes, de aspecto oleoso, estavam acondicionados em frascos âmbar com capacidade para 100 mL. Todos os produtos estavam dentro do prazo de validade. Em seus rótulos recomendava-se aplicar 3,0 mL de aromatizante em 1Kg de massa.



Figura 1 - Aromatizantes utilizados

Fonte: Autoria própria, 2016.

3.2 DEFINIÇÕES DAS DOSES.

Neste trabalho, as doses estabelecidas foram de 0,3; 0,6; 1,2; mL para os testes em *Allium cepa* L. No site o qual foi comprado os dois aromatizantes estudados, a empresa responsável sugeria-se a utilização de 3,0 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 0,3 ml. Em seguida, estabeleceram-se duas outras maiores que a considerada ideal, 0,6 e 1,2 ml. Estas doses foram analisadas individualmente e em associação, conforme descrito nos quadros 2 e 3.

Quadro 2 – Doses individuais em *Allium cepa* L.

GRUPO DE TRATAMENTO: INDIVIDUAIS
TUTTI-FRUTTI 0,3 ml
TUTTI-FRUTTI 0,6 ml
TUTTI-FRUTTI 1,2 ml
BISCOITO 0,3 ml
BISCOITO 0,6 ml
BISCOITO 1,2 ml

Quadro 3 – Doses associadas de forma igual em *Allium cepa* L.

GRUPO DE TRATAMENTO: ASSOCIADAS IGUAIS
TUTTI-FRUTTI 0,3 ml / BISCOITO 0,3 ml
TUTTI-FRUTTI 0,6 ml / BISCOITO 0,6 ml
TUTTI-FRUTTI 1,2 ml / BISCOITO 1,2 ml

3.3 OBTENÇÃO DE CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DE A. CEPA PARA A ANÁLISE CITOGENÉTICA

As cebolas foram colocadas para enraizar em frascos com água destilada, à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e aerada, até a obtenção de raízes com cerca de 2,5 cm de comprimento. Para análise de cada 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 48 horas foram escolhidos com o intuito de se avaliar a ação destas doses em mais de um ciclo celular.

No frasco de cada bulbo em estudo foram colocados a quantidade de 0,3; 0,6; 1,2; mL de sua respectiva dose de aromatizante, tendo-se o cuidado de verificar se todas as raízes estavam em contato adequado com a solução em estudo. A fixação das raízes se deu em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), a temperatura ambiente, por 24 horas. Para cada coleta de raiz, retirou-se, em média, três raízes por bulbo.

É importante explicar que para avaliação de citotoxicidade dos dois aromatizantes em questão nenhuma diluição foi realizada para a definição das doses, ou seja, teve-se o intuito de verificar a toxicidade destes aromatizantes nas raízes de *A. cepa* L. direto na solução presentes nos frascos dos aromatizantes. Optou-se por fazer desta forma em função do receio de que alguns componentes presentes nos aromatizante fossem alterados.



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

Fonte: Autoria Própria, 2016.

3.4 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 doses individuais ou associadas.

Foram observadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase (figura. 03). Foi calculado o número de células em intérfase e em divisão de cada controle e tempo de exposição e determinado o índice mitótico, da seguinte forma: (número de células em divisão presente em cada tratamento/número total de células analisadas para cada dose individual ou doses associadas) x 100.

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, anáfases multipolares (figura 04) e brotos nucleares. A análise dos resultados obtidos foi realizada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2) (programa Prisma versão 5.0, GraphPad (Software)).

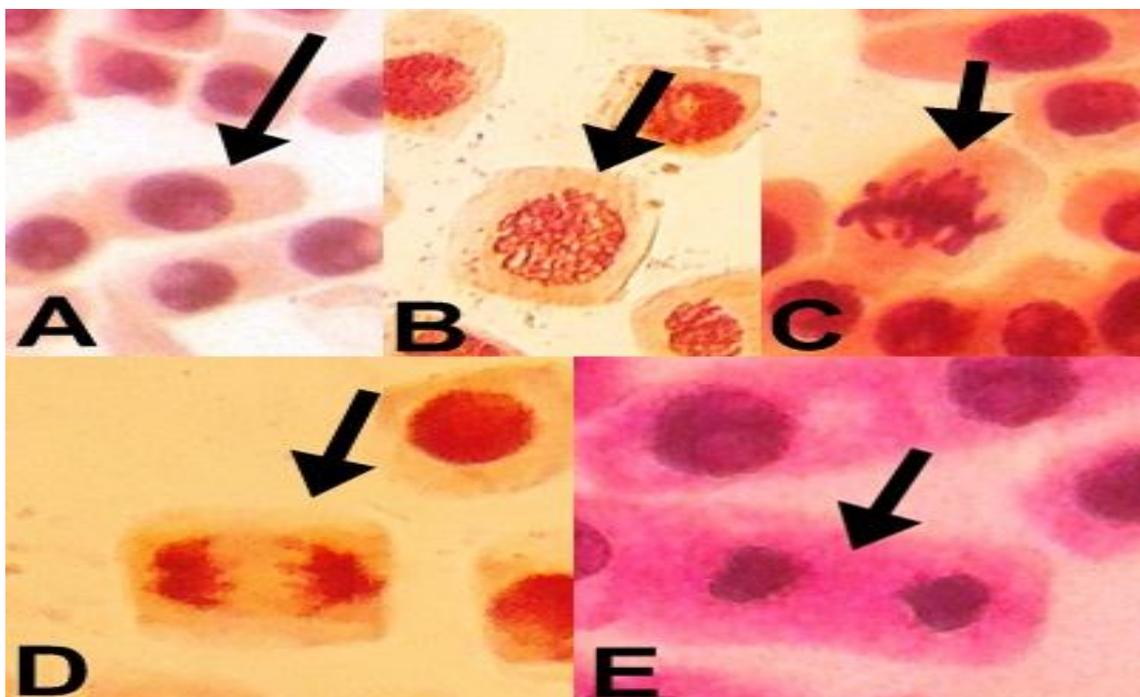


Figura 3 - Principais fases da divisão mitótica

A. Célula em interfase. B. célula em prófase. C. célula em metáfase. D. célula em anáfase. E. célula em telófase

Fonte: Autoria Própria, 2016.

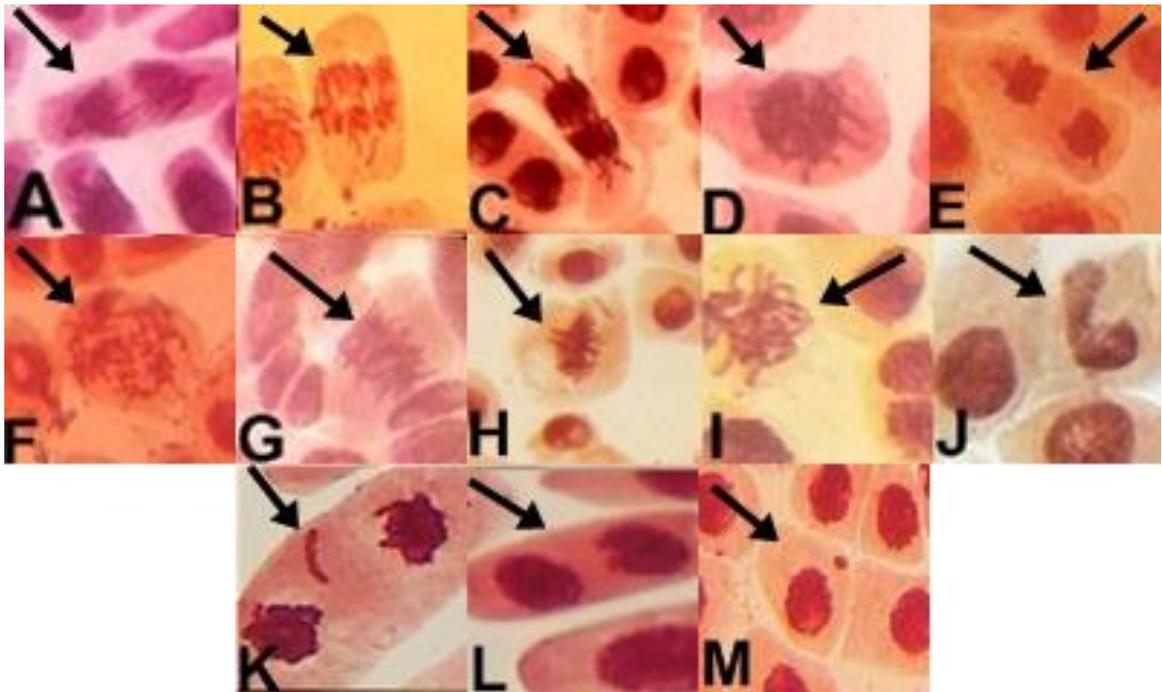


Figura 4 - Principais alterações encontradas nos tratamentos feitos com aromatizante.

A. Ponte anafásica. **B.** Anáfase com quebra cromossômica. **C.** Anáfase com atraso cromossômico. **D.** Amplificação gênica. **E.** Telófase com atraso cromossômico. **F.** Anáfase colchicínica. **G.** Metáfase poliplóide. **H.** Metáfase com quebra cromossômica. **I.** Metáfase colchicínica. **J.** Núcleo lobulado. **K.** Telófase com quebra cromossômica. **L.** Célula binucleada. **M.** Micronúcleo.

Fonte: Autoria Própria, 2016.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, é importante citar que, de acordo com o Regulamento Técnico sobre Aromatizantes/Aroma e Sabor aprovado pela ANVISA em 1999 e ainda em vigência, a formulação de qualquer aromatizante alimentar sintético é padronizada mundialmente, sendo de responsabilidade das agências de segurança alimentar a fiscalização de tal composição (Brasil, 1999; Brasil, 2007; Marques et al., 2015). Também convém enfatizar que para a realização da presente pesquisa nenhuma diluição foi realizada para obtenção das doses dos aromatizantes. Optou-se por fazer desta forma em função do receio, já que os aditivos de aroma possuem composição química complexa, de que a concentração e a ação dos compostos presentes nestes ingredientes fosse alterada. Ademais, é pertinente informar que após uma extensa busca em sites especializados na venda nacional e internacional de aditivos de aroma e sabor, a dosagem ideal para consumo, recomendada por diferentes fabricantes, foi, quase que por unanimidade, a mesma que a utilizada neste trabalho, de 3 ml de aromatizante de Tutti-frutti ou Biscoito para 1 kg de massa. Já os tempos de exposição de 24 horas e 48 horas foram estabelecidos com o intuito de se avaliar a ação destes aditivos nos meristemas de raízes em mais de um ciclo celular.

Na Tabela 01, é apresentado o número de células em interfase e em diferentes fases da divisão celular, e os valores de índice mitóticos obtidos a partir de células dos meristemas de raízes de *A. cepa* tratados com água e com os aromatizantes de Biscoito e Tutti-frutti. Estes aditivos foram avaliados individualmente e associados entre si em dois tempos de exposição. Na descrição dos resultados também são apresentados os valores significativos de χ^2 .

Tabela 01 - Número de células observadas para cada fase do ciclo celular em tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* L. tratados com água e com os aromatizantes alimentares sintéticos artificiais de Biscoito e Tutti-frutti, nas doses de 0,3; 0,6 e 1,2 ml, avaliados individualmente e em associação, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas.

AROMATIZANTE DE BISCOITO								
Dose (ml)	TE	TCII	P	M	A	T	TCD	IM (%)
0,3	CO	4090	596	155	73	86	910	18,2 ^a
	24h	4572	161	109	64	94	428	8,6 ^b

	48h	4712	113	73	43	59	288	7,8 ^b
0,6	CO	4258	556	87	47	51	741	14,8 ^a
	24h	4577	249	83	46	45	423	8,5 ^b
	48h	4679	136	96	48	41	321	6,4 ^b
1,2	CO	4291	482	105	50	72	709	14,2 ^a
	24h	4420	75	72	28	13	188	3,8 ^b
	48h	4463	17	06	08	06	37	0,7 ^c
AROMATIZANTE DE TUTTI-FRUTTI								
Dose (ml)	TE	TCII	P	M	A	T	TCD	IM (%)
0,3	CO	4508	279	110	54	49	492	9,8 ^a
	24h	4651	69	154	65	61	349	7,0 ^a
	48h	4606	88	165	101	40	394	7,9 ^a
0,6	CO	4463	304	110	72	51	537	10,7 ^a
	24h	4684	51	147	62	56	316	6,3 ^a
	48h	4664	74	128	78	56	336	6,7 ^a
1,2	CO	4208	323	137	159	73	692	11,8 ^a
	24h	4494	179	160	85	82	506	10,1 ^a
	48h	4663	162	156	101	68	487	9,7 ^a
AROMATIZANTE DE BISCOITO + AROMATIZANTE DE TUTTI-FRUTTI								
Doses associadas (ml)	TE	TCII	P	M	A	T	TCD	IM (%)
0,3 + 0,3	CO	4165	558	153	75	69	855	17,1 ^a
	24h	4130	567	139	82	82	870	17,4 ^a
	48h	4726	101	83	51	39	274	5,5 ^b
0,6 + 0,6	CO	4038	567	183	114	108	972	19,4 ^a
	24h	4654	104	153	51	38	346	7,0 ^b
	48h	4924	34	18	17	07	76	1,5 ^c
1,2 + 1,2	CO	4236	410	158	94	102	764	15,3 ^a
	24h	4727	84	81	69	39	273	5,5 ^b
	48h	4952	13	17	05	03	38	0,8 ^c

TCII – Total de células em interfase e de células indiferenciadas; TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; IM – Índice Mitótico; TCD – Total de células em Divisão. Dentro de um mesmo tratamento, valores de IM seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste χ^2 .

Os resultados apresentados na Tabela 01 mostram que os índices mitóticos obtidos para as células analisadas referentes as três doses do aromatizante de Biscoito foram significativamente menores que os índices de divisão celular obtidos para os seus respectivos controles. Já os índices de divisão celular observados para o tempo de exposição de 48 horas das doses 0,3 e 0,6 ml deste aditivo foram estatisticamente menores que seus respectivos índices mitóticos no tempo de exposição de 24 horas. Diferentemente, o índice mitótico observado para o tempo de exposição de 48 horas da dose 1,2 ml do aditivo de Biscoito mostrou-se significativamente menor em relação ao seu específico índice de divisão celular no tempo de exposição de 24 horas. Dessa forma, nas condições analisadas as doses do aromatizante de Biscoito mostraram-se citotóxicos em função de terem inibido de forma significativa a divisão celular dos meristemas de raízes estudados.

Em relação ao aromatizante de Tutti-frutti (Tabela 01), os índices mitóticos observados para as suas três doses, nos dois tempos de exposição considerados, foram estatisticamente iguais ao índice mitótico obtidos para os seus controles. De forma semelhante, quando confrontados os índices de divisão celular do tempo de exposição de 48 horas com o de 24 horas referente as doses deste aromatizante constatou-se que não diferiram estatisticamente entre si. Portanto, o aditivo de Tutti-frutti não foi citotóxico as células do organismo de prova utilizado.

Ainda na Tabela 01, os dados observados para os tratamentos decorrentes da associação entre as doses de Biscoito e Tutti-frutti mostraram que no tratamento 0,3 ml + 0,3 ml os índices de divisão celular para o controle e para o tempo de exposição de 24 horas não diferiram estatisticamente entre si. No entanto, o índice mitótico obtido para esta associação no tempo de exposição de 48 horas foi significativamente menor em relação aos índices mitóticos obtidos para os seus respectivos controle e tempo de exposição de 24 horas. Já para as outras duas associações, 0,6 ml + 0,6 ml e 1,2 ml + 1,2 ml, os valores de índice mitótico observados para os tempos de exposição de 24 e 48 horas foram estatisticamente diferentes aos índices de divisão celular referentes aos seus respectivos controles. Da mesma forma, quando confrontados os índices mitóticos obtidos para o tempo de exposição de 48 horas destes dois tratamentos com os seus específicos tempo de exposição de 24 horas verificou-se diminuição estatisticamente significativa entre eles. Assim, os tratamentos referentes as associações entre os dois aditivos aromatizantes promoveram, de forma significativa, efeito antiproliferativo aos meristemas analisados, mostrando-se, citotóxicos.

Na Tabela 2, são apresentados o número e os tipos de aberrações celulares encontradas em células meristemáticas de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com os aromatizantes

alimentares de Biscoito e Tutti-frutti, em avaliações individuais e associadas nos tempos de exposição de 24 e 48 horas, nas doses de 0,3 ou 0,6 ou 1,2 ml. Na descrição dos resultados foram apresentados os valores significativos de χ^2 .

Tabela 02 – Número e tipos de aberrações celulares observadas em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L. tratadas com água e com aromatizantes alimentares sintéticos de Biscoito e Tutti-frutti, nas doses de 0,3; 0,6 e 1,2 ml, individualmente e em associação, nos tempos de exposição de 24 e 48 horas.

AROMATIZANTE DE BISCOITO							
Dose (ml)	TE	Metáfase colchicínica	Ponte anáfásica	Ponte telofásica	Micronúcleo	Célula binucleada	TAC
0,3	CO	01	00	00	00	00	01 ^a
	24h	25	27	13	51	00	116 ^b
	48h	19	39	11	48	11	128 ^b
0,6	CO	00	00	00	01	00	01 ^a
	24h	22	15	29	43	18	127 ^b
	48h	18	22	33	37	12	122 ^b
1,2	CO	00	00	00	00	01	01 ^a
	24h	13	47	19	11	00	90 ^b
	48h	00	00	00	13	00	13 ^c
AROMATIZANTE DE TUTII-FRUTTI							
Dose (ml)	TE	Metáfase colchicínica	Ponte anáfásica	Ponte telofásica	Micronúcleo	Célula binucleada	TAC
0,3	CO	00	00	00	01	00	01 ^a
	24h	54	39	11	59	02	165 ^b
	48h	43	37	19	74	00	173 ^b
0,6	CO	00	00	00	01	00	01 ^a
	24h	22	30	27	43	00	122 ^b
	48h	23	31	21	48	00	123 ^c
1,2	CO	00	00	00	01	00	01 ^a
	24h	20	49	33	52	00	154 ^b
	48h	19	42	38	62	00	161 ^b
AROMATIZANTE DE BISCOITO + AROMATIZANTE DE TUTTI-FRUTTI							

Doses Associadas (ml)	TE	Metáfase colchicínica	Ponte anáfásica	Ponte telofásica	Micronúcleo	Célula binucleada	TAC
0,3+0,3	CO	00	00	00	01	00	01 ^a
	24h	29	59	27	78	16	209 ^b
	48h	21	48	02	21	02	92 ^c
0,6+0,6	CO	00	00	00	01	00	01 ^a
	24h	25	17	13	47	00	102 ^b
	48h	00	01	01	21	00	23 ^c
1,2+1,2	CO	00	00	00	01	00	01 ^a
	24h	23	29	20	31	00	103 ^b
	48h	00	03	00	09	00	12 ^c

TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; TAC – Total de Alterações Celulares. Dentro de um mesmo tratamento, valores de TAC seguidos da mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste χ^2 .

Os resultados apresentados na Tabela 02 mostram que as doses estudadas dos aditivos de Biscoito e de Tutti-frutti, para as duas formas de avaliação, individual e associada, ocasionaram número de micronúcleos e alterações de fuso mitótico, tais como metáfase colchicínica, ponte anáfásica e ponte telofásica, em número significativo as células meristemáticas de raízes de *A. cepa*. Portanto, no presente estudo, as doses de Biscoito e de Tutti-frutti, bem como os tratamentos em associação, foram genóxicos. Também na Tabela 02, é possível verificar que para os três tratamentos em associação, no tempo de exposição 48 horas, o número de alterações celulares foi significativamente menor em relação ao número observado para os seus respectivos tempos de exposição de 24 horas. Este resultado corrobora com os resultados descritos na Tabela 01, onde o número de células em divisão para os tratamentos mencionados foram significativamente menor em relação aos seus específicos tempo de exposição de 24 horas.

Os órgãos de vigilância alimentar EFSA e ANVISA em seus regulamentos não explicitam de forma específica quais compostos, e suas concentrações, constituem os aditivos aromatizantes. Estas informações também não são disponibilizadas nos rótulos das soluções aromatizantes comercializadas e nem nos sites especializados na venda destas substâncias. Apesar de serem estritos os estudos sobre a toxicidade em nível celular dos aromatizantes alimentares, são encontrados na literatura científica trabalhos de avaliação de citotoxicidade de alguns dos constituintes químicos das classes de diluentes e conservantes encontrados na

composição destes microingredientes. Tais compostos são permitidos e mencionados nos documentos técnicos das agências de segurança alimentar.

Dentre eles encontra-se o álcool benzóico, diluente responsável por manter a uniformidade e facilitar a incorporação e dispersão de aromas concentrados nos produtos alimentícios. Em análise da ação em nível celular deste diluente, Demir et al., (2010) verificaram que este álcool em altas concentrações promoveu danos significativos ao fuso mitótico, e, conseqüentemente, a divisão celular a células de sangue periférico humano. Outro diluente comumente usado na formulação dos aromatizantes é o diacetil (2,3-butadiona). Whittaker et al., (2008) citam que este composto em ensaio de mutação gênica em linfoma de ratos, causou danos significativos ao loci do cromossomo 11 destas células, causando perda de expressão dos genes para enzima timidina-quinase nesses animais. Ainda, More et al., (2012) verificaram que o diluente diacetil teve o potencial de substituir bases de timina por guaninas em regiões de eucromatina e de ocasionar o rompimento de pontes de hidrogênio e de dissulfeto em estrutura terciária de enzimas envolvidas no processo de divisão celular.

Já entre os conservantes presentes em aromatizantes alimentares estão o benzoato de potássio, benzoato de sódio e nitrato de potássio (Brasil, 1999), compostos que, segundo Mpountoukas et al., (2010) e Zequin et al., (2011), foram clastogênicos, mutagênicos e citotóxicos a células normais de sangue periférico humano. Também estão presentes o ácido bórico, ácido cítrico, citrato de potássio e citrato de sódio (Brasil, 1999) 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 a este sistema teste.

Para os aromatizantes alimentares, a única classe de compostos que possui restrição de uso pelos órgãos regulamentadores 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 discriminados em documento (Brasil, 1999; Brasil, 2007). Porém, para a fabricação de qualquer aromatizante alimentar é necessária a junção de mais de 20 classes de compostos químicos (Konishi et al., 2011; Xu et al., 2015).

Dessa forma, a partir dos resultados obtidos neste trabalho, juntamente com as pesquisas de avaliação da toxicidade em nível celular já realizada, verifica-se que embora a utilização de aditivos alimentares de aroma e sabor seja permitida pela EFSA e ANVISA, há urgente necessidade de estudos mais detalhados, a médio e longo prazo, para se determinar com propriedade a citotoxicidade destas substâncias e/ou das classes de compostos químicos que as constituem. É oportuno mencionar que, segundo Marques et al., (2015), a partir de

pesquisas de avaliação citotoxicológicas, a curto e médio prazo, realizadas na década de 80, os aromatizantes alimentares Esparteína, Hexanoato de alila e Quinina foram proibidos pra uso em alimentos industrializados pela ANVISA no início do anos 90.

5. CONCLUSÃO

O aditivo de Biscoito e os tratamentos em associação foram citotóxicos e genotóxicos, e o aditivo de Tutti-frutti, apesar de não citotóxico, demonstrou potencial genotóxico.

Os resultados obtidos aqui evidenciam a grande necessidade de participação mais efetiva dos órgãos de vigilância alimentar quanto aos possíveis riscos citotoxicológico dos aditivos aromatizantes a população que os consomem com ênfase aos aromatizantes de Biscoito e Tutti-frutti.

Pesquisas como esta podem auxiliar efetivamente as agências de vigilância sanitária a repensar e/ou reorganizar o conteúdo presente nos documentos normativos dos órgãos responsáveis pela regulamentação destes aditivos alimentares.

REFERENCIAS

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

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Chapter 19: Cell junctions, cell adhesion, and the extracellular matrix. **Molecular Biology of the Cell.** 4th edition. (2002).

ALBUQUERQUE, M. V.; SANTOS, S. A.; CERQUEIRA, N. T. V.; SILVA, J. A. Educação Alimentar: Uma Proposta de Redução do Consumo de Aditivos Alimentares. **Química Nova na Escola**, v. 34, n. 2, 2012

ANDRADE, C. U. B; **Mutagenicidade do extrato de casca de *Musa paradisíaca* (musaceae) em células de sangue periférico de camundongos *in vivo*.** Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade José do Vellano – UNIFENAS-MG, 2007.

AUN, M. V.; MAFRA, C.; PHILIPPI, J. C.; KALIL, J.; AGOND, R. C.; MOTTA, A. A. Aditivos em alimentos. **Revista brasileira de alergia e imunopatologia**, 2011.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacognosy.** 17(3): 444-447, Jul./Set. 2007

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

BENDINO, N. I.; POPOLIM, W. D.; OLIVEIRA, C. R. A. Avaliação do conhecimento e dificuldades de consumidores frequentadores de supermercado convencional em relação à rotulagem de alimentos e informação nutricional. **The Health Sciences Institute**, 2012; 30(3):261-5

BESSONOV, V. V. et al. Development of methods for determining acrylamide in food products by gas-liquid chromatography. **Voprosy Pitanni**, v. 80, p. 70-83, 2011.

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>. Acesso em: 13 Abril, 2015.

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: 30 de janeiro de 2016.

BRASIL, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 45, de 03 de novembro de 2010.** Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2010/rdc/028170107rdc.pdf>>. Acesso em: 19 out, 2014.

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. **Brazilian Journal Biology**. 2014; 74: 886-9. DOI: 10.1590/1519-6984.07313

CARVALHO, P. R.; Aditivos dos Alimentos. **Revista Logos**, São Paulo, n. 12, pp. 57-69, 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/gsfonline/CXS_192e.pdf.

DEMIR, E.; KOCAOGLU, S.; KAYA, R. Assessment genotoxic effects of benzyl derivatives by comet assay. **Food and Chemical Toxicology**. 2010; 48:1239-42. DOI: 10.1016/j.fct.2010.02.016.

FERREIRA, F. S.; Aditivos alimentares e suas reações adversas no consumo infantil. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, Três Corações, v. 13, n. 1, p. 397-407, 2015

GANESSAN, L.; MARGOLLES-CLARK, E.; SONG, Y.; BUCHWAL, PT. The food colorant erythrosine is a promiscuous protein-protein interaction inhibitor. **Biochemical Pharmacology** 2011; 81(6): 810-18.

GOMES, K. M. S.; 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 tatzarine yellow (E-102) on *Allium cepa* L. root meristematic cells. **Food Sciences Technology**, 2013;33:218-23. DOI: 10.1590/S0101-20612013005000012

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, SP: FUNPEC, 2002.

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. **Mutation Research**. 2012;743:24-34. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2011.12.028

HONORATO, T. C, BATISTA, E, NASCIMENTO, K. O, PIRES, T. Aditivos Alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde** (Mossoró – RN - BRASIL), v. 8, n. 5, p. 01 - 11,(Edição Especial) dezembro, 2013.

IBGE- **Brazilian Institute of Geography and Statistics**. Family Budget 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.

KOCA, N.; ERBAY, Z.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Effects of spray-drying conditions on the chemical, physical, and sensory properties of cheese powder. **Journal Dairy Sciences**. 2015; 98:2934-43. DOI: 10.3168/jds.2014-9111.

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

KURAS, 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 *Uncariatomentosa*(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 *Hymenaeastigonocarpa* Mart. (Fabaceae) on the cell cycle of *Allium cepa* L. **Anais Academia Brasileira Ciências**. 2014; 86:1147-50. DOI: 10.1590/0001-3765201420130163

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.

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. **PloS one**, v. 10, n. 2, p. e0116732, 2015

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

LOUZADA, M. L. C.; MARTINS, A. P. B.; CANELLA, D. S.; BARALDI, L. B.; LEVY, R. B.; CLARO, R. M.; MONTEIRO, C. A. Impacto f ultra-processed foodson micronutrient content in the Brazilian diet. **Revista de Saúde Pública**. V. 49, 2015.

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

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. **Food Sciences Technology**. 2015;35:183-88. DOI: 10.1590/1678-457x.6596

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

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.

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. Journal of Agricultural and Food Chemistry**. 2012; 60:3311-17. DOI: 10.1021/jf300180e.

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 and Chemical Toxicology**, 2010;48:2934-44. DOI: 10.1016/j.fct.2010.07.030.

OLIVEIRA, M. V. A.; ALVES, D. D. L.; LIMA, L. H. G. M.; CASTRO, J. M. C.; PERON, A. P. Cytotoxicity of erythrosine (E-127), brilliant blue (E-133) and red 40 (E-129) food dyes plant test system. **Acta Sciences Biology**. 2013;35:557-62. DOI: 10.4025/actascibiolsci.v35i4.18419.

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.

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.

TABREZ, S.; SAHKIL, S.; UROOJ, M.; DAMANHORI, G. A.; ABUZENADAH, A. M.; AHMAD, D. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an overview of the techniques and their efficacies. **Journal of Environmental Science and Health** 2011;29:250-75. DOI: 10.1080/10590501.2011.601849.

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 vitro and in vivo assays. **Genetics and Molecular Biology**, v. 26, n. 4, p. 551-555, 2003.

TONETTO, A.; HUANG, A.; YOKO, J.; GONÇALVES, R. **O uso de aditivos de cor e sabor em produtos alimentícios**. São Paulo: Faculdade de ciências farmacêuticas, 2008.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. **Mutation Research**. 2007;626:4-14. DOI: 10.1016/j.mrgentox.2006.07.006

VALAVANISDIS, A.; VLACHOGIANNI, T.; FIOTAKIS, K.; LORIDAS, S. Pulmonary Oxidative Stress, Inflammation and Cancer: Respirable Particulate Matter, Fibrous Dusts and Ozone as Major Causes of Lung Carcinogenesis through Reactive Oxygen Species

Mechanisms. **International Journal of Environmental Reserarsh and Public Health**. 2013, *10*(9), 3886-3907; doi:10.3390/ijerph10093886

VICENTINI, V. E. P. et al. Averrhoacarambola L., Syzygiumcumini L. Skeels and Cissussicyoides 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 toxicity using the mammalian cell gene mutation assay in L5178Y mouse lymphoma cells. **Food and Chemical Toxicology**, 2008;46:2928-33.DOI: 10.1016/j.fct.2008.06.001.

XU, Z.; GU, C.; WANG, K.; JU, J.; WANG, H.; RUAN, K.; FENG, Y. Arctigenic acid, the key substance responsible for the hypoglycemic activity of FructusArctii. **Phytomedicine**. 2015;22:128-37. DOI: 10.1016/j.phymed.2014.11.006

ZAINEDDIN, A. K.; BUCK, K.; VRIELING, A.; HEINZ, J.; FLESCHE-JANYS, D.; LINSEISEN, J.; CHANG-CLAUDE, J. The Association Between Dietary Lignans, Phytoestrogen-Rich Foods, and Fiber Intake and Postmenopausal Breast Cancer Risk: A German Case-Control Study. **Nutrition and Cancer**. Volume 64, Issue 5, 2012

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 and Chemical Toxicology**, 2011; 49:763-69. DOI: 10.1016/j.fct.2010.11.040.

ZILIFDAR, F.; ALPER-HAYTA, S.; YILMAZ, S.; KAPLAN-OZEN, Ç.; FOTO, E.; AYDOGAN, Z.; YILDIZ, I.; AKI, E.; YALÇIN, I.; DIRIL, N. Genotoxic potentials and eukaryotic DNA topoisomerase I inhibitory effects of some benzoxazine derivatives. **Medicinal Chemistry Research**.2014, Volume 23, Issue 1, pp 480-486



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

Identificação do Tipo de Documento

- () Tese
 () Dissertação
 (X) Monografia
 () Artigo

Eu, Ila Monize Sousa Sales ,

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

 Análise litogénica da toxicidade de aditivos aromatizantes sintéticos artificiais.

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 20 de maio de 20 16 .

 Ila Monize Sousa Sales
Assinatura

 Ila Monize Sousa Sales
Assinatura