



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUÍ
CAMPUS SENADOR HELVÍDIO NUNES DE BARROS – PICOS
CURSO DE LICENCIATURA EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

JAILSON RODRIGUES DOS SANTOS

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DO ADITIVO ALIMENTAR TARTRAZINA EM
ESTUDOS *IN VITRO* UTILIZANDO DIFERENTES CÉLULAS EUCARIÓTICAS**

PICOS – PI
2017

JAILSON RODRIGUES DOS SANTOS

**EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DO ADITIVO ALIMENTAR TARTRAZINA EM
ESTUDOS *IN VITRO* UTILIZANDO DIFERENTES CÉLULAS EUCARIÓTICAS**

Monografia apresentada como pré-requisito para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros.

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

PICOS – PI

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Processamento Técnico da Universidade Federal do Piauí

Biblioteca José Albano de Macêdo

S237e Santos, Jailson Rodrigues dos.

Efeitos toxicogenéticos do aditivo alimentar tartranzina em estudos *in vitro* utilizando diferentes células eucarióticas / Jailson Rodrigues dos Santos.– 2017.

CD-ROM : il.; 4 ¾ pol. (57 f.)

Trabalho de Conclusão de Curso (Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2018.

Orientador(A): Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

1. Aditivo Alimentar. 2.Citotoxicidade. 3.Carcinogênese.
I. Título.

CDD 571.6

JAILSON RODRIGUES DOS SANTOS

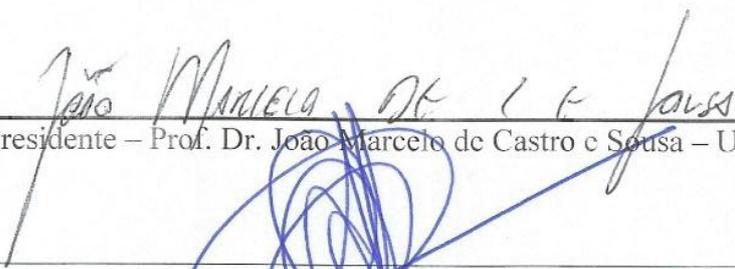
EFEITOS TOXICOGENÉTICOS DO ADITIVO ALIMENTAR TARTRAZINA EM ESTUDOS *IN VITRO* UTILIZANDO DIFERENTES CÉLULAS EUCARIÓTICAS

Monografia apresentada como pré-requisito para obtenção do Grau de Licenciado em Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Piauí, Campus Senador Helvídio Nunes de Barros.

Orientador: Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa

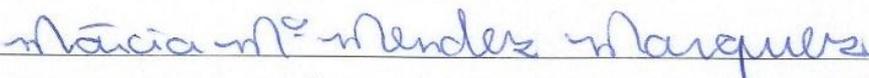
Aprovado em: 07/12/2017

Banca Examinadora:



Presidente – Prof. Dr. João Marcelo de Castro e Sousa – UFPI

Examinador (a) – Profa. Dra. Ana Carolina Landim Pacheco - UFPI



Examinador (a) – Prof^ª. Dra. Márcia Maria Mendes Marques - UFPI

Dedico primeiramente a Deus, pois sem ele eu não teria forças para concluir essa longa jornada. Dedico aos meus professores e aos meus colegas que sempre estiveram à disposição para me ajudar nessa tarefa árdua, aos meus pais, Francisco Severiano Rodrigues e Antônia Maria Rodrigues pelo incentivo e apoio, pois sem eles nada eu seria, e a minha esposa Ana Gabriele de Moura pelo apoio e encorajamento para concluir mais essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por todas as bênçãos derramadas em minha vida, pelo amor e piedade que tevês comigo em toda a minha vida, sempre me presenteando com força e sabedoria no decorrer da minha caminhada, cuidando e abençoando cada passo que dou em minha vida, sempre me guiando pelo caminho correto. Agradeço do íntimo do meu coração por todas as vezes que cuidou de mim.

Agradeço imensamente a minha família pelo apoio e incentivo em todos esses anos, principalmente meu pai Francisco Severiano Rodrigues e minha Mãe Antônia Maria Rodrigues, a minha esposa Ana Gabriele de Moura pela paciência e amor que dedicar-me durante esses anos, além da paciência e entendimento nas vezes que precisava estudar até tarde e de madrugada, muito obrigado pelo apoio meus maiores amores.

Aos meus amigos, colegas de classe, e demais familiares, principalmente aqueles que acompanharam a minha caminhada durante esses anos, deixo o meu agradecimento ao Eduardo, Railma, Valdenia, Joyce, Raila, Roberta, Isleia, Itamar, Layse, Carol, Augusto, Henrique, Jussara, Simone, Flávio e demais integrantes da LAOH (Liga Acadêmica de Oncologia e Histologia), pela força e acolhimento e muitos outros que de certa forma contribuíram para a minha formação pessoal e profissional, agradeço em especial a minha amiga Larissa Soares pelas manhãs, tardes e noites preparando lâminas e coletando materiais para o meu TCC.

Ao meu amigo e orientador, o Professor Dr. João Marcelo de Castro e Sousa, pelo apoio, paciência, disponibilidade, conhecimentos transmitidos ao longo desta etapa e pela força que me desde no exato momento em que mais precisei. Você é uma pessoa muito admirável professor. Agradeço também ao professor e amigo Felipe Cavalcante quanto professor e coordenador, pela ajuda, força e esclarecimentos, e aos demais professores que contribuíram para minha formação profissional e pessoal, alguns me inspirando positivamente como pessoa, obrigado Maria Carolina por ser essa pessoa que passa alegria e competência nas aulas, Ana Carolina pelos ensinamentos passados no decorrer desses anos eis uma excelente profissional, Ana Paula Peron pelas aulas maravilhosas que ministrava, Socorro pelos puxões de orelhas e ensinamentos, Paulo Victor pelo exemplo de professor a ser seguido, Márcia pelas aulas incríveis, foi muito prazeroso assistir suas aulas de Biofísica, e aos demais professores do curso, todos ficaram marcados em minha vida, pois vocês me inspiram a ser uma pessoa melhor a cada dia.

LISTA DE FIGURAS

INTRODUÇÃO GERAL E REVISÃO DE LITERATURA

Figura 01: Cistos (A) e o processo de crescimento e diferenciação (B) do microcrustáceo <i>A. salina</i>	08
Figura 02: Método esquemático utilizado para análise das células meristemáticas do <i>Allium cepa</i>	09
Figura 03: leveduras de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> em cultura bem como sua visualização em microscópio de varredura.....	10

ARTIGO CIENTÍFICO

Figura 01: Estrutura química do corante alimentar Tartrazina	18
Figura 02: Semeio das linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para determinação do potencial oxidante ou antioxidante de compostos	22
Figura 03: Porcentagem da viabilidade celular da linhagem estomacal normal MN01 exposta a diferentes concentrações de tartrazina	22
Figura 04: Atividade tóxica do corante Tartrazina em diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) por meio do Bioensaio de Letalidade em <i>Artemia salina</i> (BSLB) utilizando o tempo de exposição de 48hs	23
Figura 05: Perfil fotomicrográfico das células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> tratados com o corante alimentar Tartrazina. Coloração com orceína acética e aumento de 400X ao microscópio óptico. A: células em diferentes fases do ciclo celular; B: MN em prófase; C: c-metáfase; D: Ponte cromossômica em anáfase; E: perda cromossômica em metáfase; F: atraso cromossômica em anáfase.....	26

LISTA DE TABELAS

ARTIGO CIENTÍFICO

Tabela 01: As linhagens de levedura <i>S. cerevisiae</i> que foram utilizadas no estudo.....	21
Tabela 02: Efeito tóxico e citotóxico da Tartrazina em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> . One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de significância, ^a : comparado ao controle negativo (CN); ^b : comparado ao Controle positivo (CP). $p < 0,05$	25
Tabela 03: Efeito mutagênico da Tartrazina em células meristemáticas de <i>Allium cepa</i> . Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Valores de significância, ^a : comparado ao controle negativo (CN); ^b : comparado ao Controle positivo (CP). $p < 0,05$	26
Tabela 04: Avaliação oxidante/antioxidante do aditivo alimentar Tartrazina em diferentes concentrações utilizando linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mutadas em enzimas antioxidantes. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mm).....	27

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO GERAL	10
2 REVISÃO DA LITERATURA	12
2.1 Alimentação como fator de risco para câncer	12
2.2 Aditivos alimentares e os riscos à saúde	13
2.3 Corantes artificiais	15
2.4 Tartrazina.....	16
2.5 Modelos de estudo para o monitoramento toxicogenético	17
2.5.1 Bioensaios de letalidade em <i>Artemia salina</i>	17
2.5.2 Bioensaio <i>Allium cepa</i>	18
2.5.3 Linhagens de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	20
REFERÊNCIAS	22
1.0 ARTIGO CIENTÍFICO	28
1.1 Introdução	29
1.2 Material e métodos	30
1.2.1 Obtenção do aditivo alimentar e definições de concentrações	30
1.2.2 Ensaio citotóxico de MTT	31
1.2.2.1 Cultivo das células.....	31
1.2.2.2 Procedimento experimental	31
1.2.3 Bioensaio de letalidade em <i>Artemia salina</i> (BSLB).....	32
1.2.4 Obtenção das células meristemáticas de raízes de <i>A. cepa</i>	33
1.2.4.1 Preparo, leitura das lâminas e análise citogenética para o teste <i>A. cepa</i>	33
1.2.5 Linhagens de leveduras utilizadas	33
1.2.5.1 Capacidade oxidante em células de leveduras <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
1.2.6 Análise estatística	35
1.3 Resultados	35
1.3.1 Avaliação da citotoxicidade por ensaio MTT	35
1.3.2 Toxicidade do corante Tartazina	36
1.3.3 Avaliação tóxica e citotóxica do aditivo alimentar Tartrazina	37
1.3.4 Avaliação mutagênica do aditivo alimentar Tartrazina.....	39
1.3.5 Avaliação da capacidade oxidante de Tartrazina	40
1.4 Discussão	41
1.5 Conclusão	43
1.6 Referências	44
ANEXO	48

1 INTRODUÇÃO GERAL

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 (OLIVEIRA et al., 2014). Dentre os aditivos alimentares, os corantes são atualmente os mais utilizados pela população. Os mesmos são abundantemente utilizados pelas indústrias de alimentos, visando principalmente conferir, restaurar ou intensificar a cor dos alimentos (PRADO E GODOY, 2007), proporcionando uma aparência agradável aos olhos após o seu processamento, possibilitando aumentar o número e a variedade de produtos industrializados com várias tonalidades, já que a cor é uma das primeiras qualidades sensoriais pelas quais os alimentos são julgados pelos consumidores, sendo associada com a qualidade e sabor (PIASINI et al., 2014).

Em meados do século XIX, os corantes disponíveis eram de origem animal, vegetal ou mineral e os pigmentos naturais foram progressivamente sendo substituídos por corantes sintetizados, submetidos às disposições legais próprias de cada país (Piasini et al., 2014). No Brasil, de acordo com a Agência de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2017) é permitido o uso de 11 corantes artificiais (Amaranto, Vermelho de ritrosina, Vermelho 40, Ponceau 4R, Amarelo crepúsculo, Amarelo tartrazina, Azul de indigotina e Azul brilhante, Azorrubina, Verde rápido e Azul patente V). Dos corantes apresentados destaca-se o amarelo Tartrazina ou Tartrazina (TRZ) devido sua associação a reações adversas (urticária, asma, hiperatividade) em consumidores, além de suas controvérsias em relação aos seus possíveis efeitos toxicológicos em diferentes organismos (POUL et al., 2009).

A toxicidade dos corantes sintéticos e os riscos que estes podem causar à saúde é objeto de discussão atualmente. Problemas de saúde, como alergias, rinite, broncoconstrição, hiperatividade, além de causar alterações cromossômicas e possivelmente neoplasias, têm sido reportados pela literatura, relacionando-os ao uso de corantes (DWIVEEDI et al., 2015). O corante Tartrazina, por exemplo, tem potencial expressivo para causar distúrbios de hipersensibilidade, afetando de 0,6% a 2,9% da população, com maior incidência em indivíduos intolerantes aos salicilatos ou nos indivíduos atópicos (POLÔNIO et al., 2009).

De todos os aditivos alimentares utilizados na indústria alimentícia nacional e mundial, os corantes alimentares são os mais genotóxicos (SASAKI et al., 2002). Em países demasiadamente industrializados a ocorrência de câncer intestinal torna-se comum, podendo existir a possibilidade de estar ligado diretamente ao consumo demasiado de alimentos com corantes como, por exemplo, a Tartrazina (SASAKI et al., 2002). Assim, os aditivos

alimentares vêm sendo alvo de estudos e têm despertado o interesse dos pesquisadores não somente pelas suas características benéficas ao processamento e venda de um determinado produto, mas também pelo seu potencial tóxico, podendo ocasionar desde alergias até o desenvolvimento de instabilidades genéticas levando à carcinogênese (SANTOS e NAGATA, 2005).

Algumas pesquisas mostram os efeitos toxicogenéticos da Tartrazina, onde a mesma pode interagir com o DNA, induzir o estresse oxidativo por formação de radicais livres, danos ao DNA e alterações cromossômicas em algumas células de mamíferos (POUL et al., 2009; MPOUNTOUKAS et al., 2010), podendo também além de estimular o processo mutagênico causar a diminuição da viabilidade celular (DEMIRKOL et al., 2012). A grande problemática, nesse caso, além da utilização do corante, principalmente por crianças que são principais consumidores de alimentos coloridos (MEHEDI et al., 2013) é a questão da concentração desse composto nos alimentos que muitas vezes, observa-se o uso excessivo em diversos produtos alimentícios (KASHANIAN e ZEIDALI, 2011).

Portanto, apesar do controle exigido por lei, a utilização de aditivos alimentares, tais como, a Tartrazina continua levantando uma séria de dúvidas quanto à toxicidade e suas concentrações ideais, uma vez que na literatura, artigos com esse ímpeto ainda são controversos o que justifica a realização desse presente trabalho que teve como objetivo principal a avaliação citotóxica, genotóxica e mutagênica *in vitro* do corante Tartrazina em diferentes tipos de células eucarióticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Alimentação como fator de risco para câncer

O câncer é uma neoplasia que pode resultar da interação entre fatores genéticos e ambientais bem como por alterações químicas endógenas e infecções virais. A transformação de uma célula normal para uma célula tumoral é um processo de vários estágios que pode levar a lesões pré-cancerosas e neoplasias malignas (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2017). Vários fatores relacionados ao câncer acarretam em instabilidades genéticas que é comumente envolvida em alterações do genoma durante o ciclo de vida das células sendo uma das forças principais para o início do processo de formação das células tumorais (SYEED et al., 2014). Com o crescente aumento populacional e o envelhecimento contínuo da população, o perfil epidemiológico do câncer tem sofrido alterações, afetando significativamente o impacto das neoplasias no cenário mundial (VERAS, 2007). O estilo de vida da sociedade moderna contribui para aumentar a exposição da população a alguns fatores ambientais, nutricionais, químicos e hormonais potencialmente carcinogênicos (SOUSA, 2017).

Dentre as principais fontes de exposição do homem a agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos pode-se citar a dieta, seja pela própria composição dos alimentos ou pelo seu preparo, uso de tempero, corantes e outros aditivos ou de contaminantes presentes nos mesmos (DÜSMAN, 2012). Muitos componentes da alimentação têm sido associados com o processo de desenvolvimento do câncer, principalmente câncer de mama, cólon (intestino grosso) reto, próstata, esôfago e estômago (INCA, 2014).

A ingestão de alimentos é uma das principais vias de exposição do homem a diferentes compostos, visto que uma mistura complexa de agentes químicos é encontrada na dieta. Algumas das substâncias presentes em determinados alimentos podem induzir mutações no DNA e podem favorecer o desenvolvimento de tumores (ANTUNES e ARAÚJO, 2000; HERCEG, 2007). Substâncias potencialmente mutagênicas e/ou carcinogênicas estão presentes nos mais diferentes contextos, como nos medicamentos, plásticos, detergentes, tintas, cosméticos, roupas, agrotóxicos, produtos de limpeza e desinfecção, em ambientes rurais e industriais, além da poluição típica dos grandes centros urbanos (GRISOLIA, 2005).

Os hábitos alimentares veem sofrendo grandes modificações ao longo do tempo onde alimentos *in natura* estão sendo gradativamente substituídos por alimentos industrializados. Esse fato tem gerado questionamentos e preocupações quanto à segurança do emprego de aditivos alimentares (DALL'AGNOL et al., 2013; POLÔNIO e PERES, 2009). É evidente a

importância dos aditivos sob o ponto de vista tecnológico na produção de alimentos. Porém, é necessário estar atento aos possíveis riscos toxicológicos que podem ser acarretados pela ingestão frequente dessas substâncias (POLÔNIO, 2010). Distintas pesquisas têm mostrado reações tóxicas incididas pelos aditivos, quer seja aguda ou crônica, que desencadearam processos alérgicos, alterações neurocomportamentais e, em longo prazo, neoplasias (DI LORENZO et al., 2002; GUIMARÃES 2010; MOUTINHO et al., 2007).

Além de a dieta ter sofrido modificações ao longo do tempo, a tecnologia aplicada pela indústria de alimentos com o intuito de aumentar o tempo de vida útil desses produtos tem gerado questionamentos quanto à segurança do emprego de aditivos alimentares, fundamentalmente quando se trata de corantes artificiais (SANDHI, et al., 2005). Foi analisada a qualidade dos doces em massa do tipo junino quanto à identidade, por meio da pesquisa de elementos histológicos e corantes orgânicos artificiais, presença de matérias estranhas e rotulagem. Das 15 amostras coletadas no comércio, nove (60%) foram condenadas devido à presença de corantes orgânicos artificiais, e duas por rotulagem incompatível com a legislação vigente. O corante amarelo crepúsculo foi encontrado em 23,3% da amostra, seguido do ponceau 4R (13,3%) e do amarelo tartrazina (10%). Segundo os autores, a legislação brasileira não permite a adição de corantes em doce em pasta (Resolução Normativa nº. 09/78). Dessa forma, o emprego de corantes configurou fraude. (FREITAS, et al., 2006).

A alimentação e a nutrição inadequadas são classificadas como a segunda causa de câncer no mundo, o qual pode ser prevenido. São responsáveis por até 20% dos casos de câncer nos países em desenvolvimento, como o Brasil, e por aproximadamente 35% das mortes pela doença. A alimentação pode desencadear o desenvolvimento de neoplasias pelo excesso de consumo de alimentos que provocam alterações celulares e genéticas que levam ao câncer, como por exemplo: gorduras saturadas, alimentos industrializados, açúcares refinados, aditivos alimentares dentre outros. (MEDEIROS, 2009). Caso a população adotasse uma alimentação saudável e a prática regular de atividade física, mantendo o peso corporal adequado, aproximadamente um em cada três casos dos tipos de câncer mais comuns poderiam ser evitados. Ou seja, para cada 100 pessoas com câncer, 33 casos poderiam ser prevenidos (INCA, 2017).

2.2 Aditivos alimentares e os riscos à saúde

Os aditivos alimentares são substâncias químicas que formam um grupo bastante heterogêneo de substâncias que se classificam, de acordo com sua função em: agentes

conservantes (antioxidantes ou antimicrobianos), acidulantes, emulsificantes, estabilizantes, espessantes, umectantes, anti-umectantes, corantes, flavorizantes (realçadores de sabor) e adoçantes (AUN et. al., 2011).

Com o advento da vida moderna, cada vez mais esses aditivos alimentares vem sendo empregados. Atualmente, é quase impossível encontrar um alimento sem aditivos (AUN et al., 2011). No entanto, 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. Apesar de sua ampla utilização, são substâncias capazes de desencadear reações adversas como qualquer outra droga. Há uma controvérsia em relação à prevalência, manifestações clínicas e mecanismos de ação das reações provocadas pelos aditivos alimentares (WILSON et al., 2005).

Segundo a ANVISA, o emprego de aditivos justifica-se por razões tecnológicas, nutricionais ou sensoriais. A avaliação dos aditivos alimentares no âmbito mundial é baseada no controle das IDAs (Ingestão Diária Aceitável), desenvolvida pelo Comitê de Expertos em Aditivos Alimentares (POLÔNIO et al., 2009). Os questionamentos quanto à segurança do emprego de aditivos alimentares, tais como os corantes artificiais, só aumentar devido a utilização inadequada dos mesmos bem como seis efeitos adversos ao organismo humano (MOUTINHO et al., 2007).

Vários estudos já buscaram demonstrar as reações adversas que os corantes ocasionam em seres humanos. O monitoramento da quantidade destes em alimentos tem, continuamente, contribuído para alertar quanto ao consumo consciente desses produtos alimentícios. (GOUVEIA, 2006). Quando o assunto é a qualidade dos corantes artificiais existem diferentes opiniões, conseqüentemente, países e regiões diferentes permitem o uso distinto de corantes e em quantidades diferentes. Com o aumento do consumo de alimentos industrializados conseqüentemente há o aumento do consumo de diversos aditivos alimentares entre eles os corantes. Desde que obedeçam aos percentuais estabelecidos pela ANVISA e/ou pelo Codex Alimentarius suas utilizações é permitida. Estes estabelecem para cada aditivo a quantidade diária aceitável de ingestão (IDA) no qual os aditivos passam a ser inofensivos.

Todos os corantes artificiais permitidos pela legislação brasileira já possuem valores definidos de IDA, (ANVISA, 2017) embora esses valores estejam sujeitos a alterações contínuas dependendo dos resultados de estudos toxicológicos. O comitê de peritos da FAO (Food and Agriculture Organization) e da OMS (Organização Mundial da Saúde) para aditivos alimentares, o JECFA (Joint Expert Committee on Food Additives), recomenda que os países verifiquem sistematicamente o consumo total de aditivos permitidos, através de

estudos da dieta de sua população, para assegurar que a ingestão total não ultrapasse os valores determinados na IDA (Machado, 2010). Os estudos sobre os efeitos nocivos causados pelos corantes artificiais à saúde são insuficientes e bastante contraditórios. Os corantes podem causar desde simples urticárias, passando por asma e reações imunológicas, chegando até ao câncer em animais de laboratórios (ELHKIM et al., 2007).

2.3 Corantes artificiais

A utilização de corantes artificiais é sem dúvida um dos mais polêmicos avanços alcançados pela indústria de alimentos. Ainda existem diferentes opiniões quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais. Visando, principalmente, o controle no uso dos corantes sintéticos, mas tendo em vista que produtos coloridos artificialmente são exportados e importados, a análise desses aditivos requer métodos eficientes e rápidos para a detecção, identificação e quantificação (PRADO e GODOY, 2003). São produzidas mundialmente, aproximadamente 700.000 toneladas/ano de 10.000 diferentes tipos de corantes e pigmentos, fazendo parte dos processos industriais das mais diversas áreas (HABIBI et al., 2005; Freitas, 2012).

De acordo com a Resolução n.º 44, de 25 de novembro de 1977, da Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos (CNNPA) do Ministério da Saúde, é considerado corante alimentício a substância ou mistura de substâncias que possuem a propriedade de conferir ou intensificar a coloração de alimento (e bebida). Não são incluídos nessa categoria os sucos, extratos de vegetais e outros ingredientes utilizados na elaboração de alimentos que já possuam Anais na coloração própria, a menos que haja uma adição de uma substância com a finalidade de intensificar a coloração própria do produto (VELOSO, 2012).

As civilizações antigas já tinham o hábito de retirar substâncias da natureza para colorir seus alimentos, e assim melhorar sua aparência. Egípcios adicionavam extratos naturais e vinhos para melhorar a aparência de seus produtos. Muitas substâncias de origem animal, vegetal ou mineral utilizadas como especiarias e condimentos, já tinham o objetivo de colorir os alimentos, mas foram gradualmente substituídas por outras com o objetivo específico de conferir cor (PRADO e GODOY, 2003). Com a descoberta dos corantes sintéticos nos séculos XVIII e XIX, bem como da influência da cor na aparência e, conseqüentemente, de uma maior aceitação dos produtos pelos consumidores, o interesse das indústrias pelo uso dos corantes artificiais aumentou, inclusive na tentativa de mascarar alimentos de baixa qualidade. Desde então, os corantes sintéticos foram cada vez mais usados,

especialmente por apresentarem maior uniformidade, estabilidade e poder tintorial em relação às substâncias naturais, incentivando novas descobertas (HANSEN, 2006).

As cores estão intimamente ligadas a vários aspectos da nossa vida e são capazes de influenciar as nossas decisões do dia-a-dia, principalmente, as que envolvem os alimentos. A aparência, segurança, características sensoriais e aceitabilidade dos alimentos são todas afetadas pela cor. A cor pode afetar outras características sensoriais e essa inter-relação pode influenciar no aceite ou não do alimento (FENNEMA, 2010). A cor influencia no sabor, na aceitabilidade e, conseqüentemente, na preferência por certos alimentos e bebidas (CASÉ et al., 2005).

Na França, avaliou-se a segurança do consumo do corante tartrazina a partir de uma revisão sistemática de estudos experimentais. O consumo teórico máximo estimado de tartrazina foi de 14,5% e 37,2% da IDA (7,5 mg/kg de peso corporal) para adultos e crianças, respectivamente. Quanto à associação do consumo de tartrazina e efeitos adversos à saúde, os autores acreditam que a mesma é superestimada, e os mecanismos patogênicos ainda não foram suficientemente estudados e definidos. (ELHKIM, et al., 2007).

No Japão, com base na técnica do ensaio cometa, foram avaliados se os aditivos alimentares mais consumidos no país induziam danos no DNA dos ratos. A administração dos aditivos foi oral em até 0,5 x LD50 ou na dose limite de 2.000 mg/kg. O estudo demonstrou danos no DNA em órgãos de ratos provocados por alguns aditivos. O corante tartrazina na dose ≥ 10 mg/kg induziu danos no DNA do estômago e cólon. Já o amaranço (100 mg/kg), provocou danos no DNA da bexiga. Os corantes: amarelo crepúsculo, azul brilhante e carmin não acarretaram danos estatisticamente significativos (INOUE et al., 2006).

2.4 Tartrazina

Levando em consideração que o aspecto visual é um importante fator para que um produto seja selecionado e escolhido pelo consumidor, os corantes tornam-se aditivos químicos importantes para as indústrias de alimentação na conquista do mercado (SHUMANN et al., 2008). Em contrapartida existem estudos que visam demonstrar as reações adversas que podem ocorrer em decorrência do seu uso. Logo, o monitoramento dos teores de corantes em alimentos tem contribuído para um consumo consciente. (PRADO e GODOY, 2007). Todavia, opiniões divergem quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais. Portanto, pode haver o uso diferenciado de corantes em países ou regiões distintas,

que podem permitir o emprego destas substâncias em quantidades diferentes, devido a seu maior ou menor consumo na dieta da população (HAMERSKI et al., 2013).

Quando se leva em consideração os corantes artificiais que mais causam neoplasias, alergias e espasmos, a Tartrazina é a que mais se destaca. O mesmo dá coloração amarela a doces, sucos, mostarda, refrigerantes, gelatinas, medicamentos, cosméticos, entre outros. O Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) determinou a ingestão diária aceitável (IDA) para a Tartrazina em até 7,5 mg/kg de peso corpóreo. Já as quantidades permitidas nos alimentos variam conforme o produto. Para bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, é permitida a utilização de Tartrazina na quantidade máxima de 0,01 g/100mL. Para gelados comestíveis, a quantidade máxima é de 0,015 g/100mL (ANVISA, 2007).

O amarelo tartrazina tem destaque quando se fala em corantes causadores de alterações humanas (PERES, 2009). O mesmo tem sido alvo de estudos de mutagênese e carcinogênese por produzir, como todos os corantes azoicos, uma amina aromática ácido sulfanílico, após ser metabolizado pela microflora gastrointestinal (MOUTINHO et al., 2007). A Tartrazina induz ao dano no DNA em estômago, cólon e/ou bexiga urinária com dose de 10 mg.kg⁻¹. Esta dose é próxima a aceitável para o consumo pela IDA (SASAKI et al., 2002). Sob o ponto de vista tecnológico, os aditivos assumem papel importante na produção de alimentos. No entanto, deve haver uma preocupação maior no que se refere aos riscos toxicológicos provocados pela ingestão diária dessas substâncias (POLONIO e PERES, 2009).

2.5 Modelos de estudo para o monitoramento toxicogenético

2.5.1 Bioensaios de letalidade em *Artemia salina*

A avaliação de citotoxicidade é indispensável para considerar a utilização de um composto químico seguro. Compostos sintéticos são quase sempre tóxicos em altas doses. Portanto, a avaliação da letalidade em um organismo animal menos complexo pode ser usada para um monitoramento simples e rápido de um composto químico. O ensaio de letalidade para larvas de *Artemia salina* tem sido introduzido na rotina de muitos grupos de pesquisa envolvidos com isolamento, purificação e elucidação estrutural, já que muitos laboratórios de pesquisa não estão preparados para a realização de ensaios biológicos (RUIZ et al., 2005). Esta metodologia se popularizou como bioensaio principalmente a partir da década de 90 (LHLLIER; HORTA; FALKENBERG, 2006).

O teste de citotoxicidade com esse microcrustáceo (Figura 01) é um método simples na pesquisa toxicológica (MEYER et al., 1982) onde os cistos dos microcrustáceos são de baixo custo e facilmente encontrados no comércio, além de permanecerem viáveis por anos no estado seco, possuindo uma boa correlação com testes de toxicidade aguda oral *in vivo* (PARRA et al., 2001), quanto em linhagem de células humanas (CARBALHO et al., 2002). O ensaio determina valores de concentração letal média (CL50), em $\mu\text{g/mL}$, de compostos e extratos, sendo que inúmeras substâncias ativas conhecidas apresentam citotoxicidade por este teste (MEYER et al., 1982).

Figura 01: Cistos (A) e o processo de crescimento e diferenciação (B) do microcrustáceo *A. salina*



Fonte: <<https://br.pinterest.com/pin/551479916862349905>>, 2017.

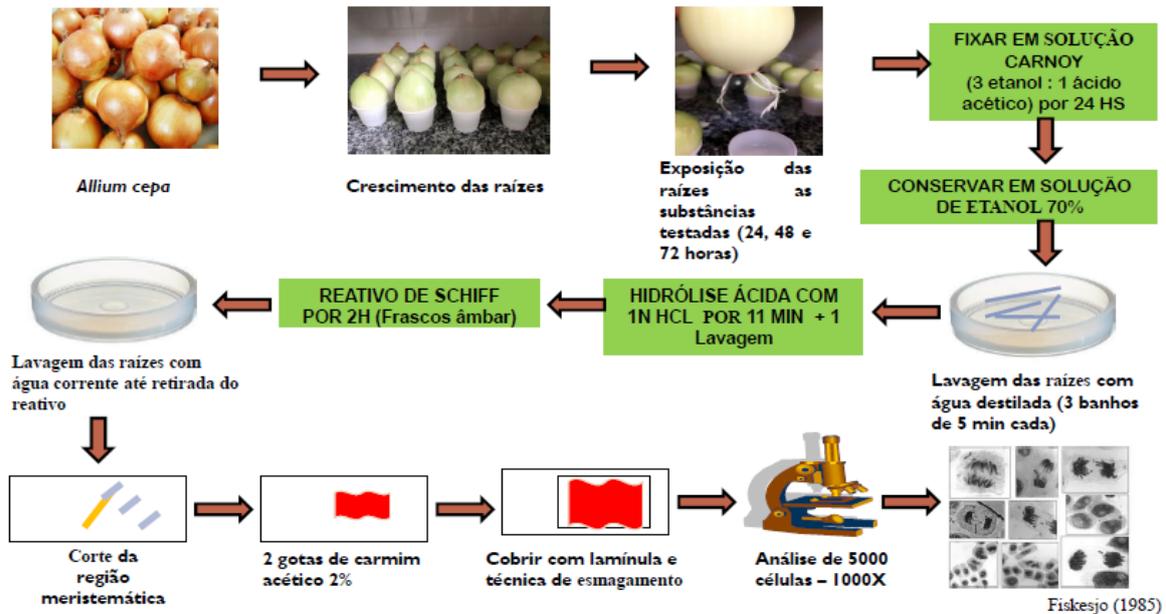
2.5.2 Bioensaio *Allium cepa*

Sistemas testes vegetais são de grande importância na avaliação de riscos de genotoxicidade sendo enfatizado que apesar das diferenças entre os metabolismos de plantas e animais, há também similaridades, e que a ativação de pró-mutagênicos em plantas possui alta relevância, pois seres humanos consomem plantas tratadas com agentes químicos (FISKEJO, 1994). Os estudos citogenéticos de espécies vegetais informam a respeito de possíveis alterações cromossômicas nas plantas devido à presença de agentes mutagênicos na sua composição ou decorrentes do seu metabolismo. O estudo dos mutagênicos em núcleos eucarióticos vem sendo observado através de métodos citológicos. A mutação pode resultar da ação de compostos químicos, ambientais e radioativos e da estabilidade intrínseca dos ácidos nucleicos (BAGATINI et al., 2007).

Existe uma variedade de plantas que são utilizadas para ensaios de toxicidade, no entanto, uma das mais conhecidas e bem estabelecidas plantas utilizadas em bioensaios citogenéticos é o *Allium cepa*. A cebola pode germinar facilmente e as raízes coletadas são

simples de armazenar. Os fatores macroscópicos e microscópicos podem ser avaliados nessa espécie sem muito esforço (LIMAN, 2013). Finalmente, é importante observar que existe uma relação entre os resultados obtidos a partir de bioensaios de plantas e outros sistemas de ensaio (FIRBAS; AMON, 2013; MAITI et al., 2013), o que aumenta a sua utilidade (Figura 2).

Figura 02: Método esquemático utilizado para análise das células meristemáticas do *Allium cepa*.



Fonte: Arquivo pessoal

Plantas superiores, como *Allium cepa*, têm sido amplamente utilizadas em testes de genotoxicidade para detectar e avaliar a influência de substâncias em um organismo (ARYA; MUKHERJEE, 2014). O Programa Internacional de Segurança Química (IPCS – *International Programme on Chemical Safety*) e o Programa Ambiental das Nações Unidas (UNEP – *United Nations Environment Programme*) certificaram o bioensaio de *Allium cepa* como um método padrão para o monitoramento genotóxico de poluentes ambientais (RAJESHWARI et al., 2016).

Bioensaios com *A. cepa* se mostram bastante econômicos, além de bem sensíveis, e os resultados apresentam uma boa correlação com sistemas de testes de mamíferos (HEMACHANDRA; PATHIRATNE, 2016). As razões para escolher *A. cepa* como um modelo *in vivo* para avaliar os efeitos tóxicos é devido suas raízes poderem crescer em contato direto com qualquer substância de interesse, possuírem um número estável de cromossomos e cariótipos, mostrar uma fase mitótica clara, a ocorrência de danos cromossômicos espontâneos ser rara, mostrar uma resposta rápida aos materiais genotóxicos, apresentar

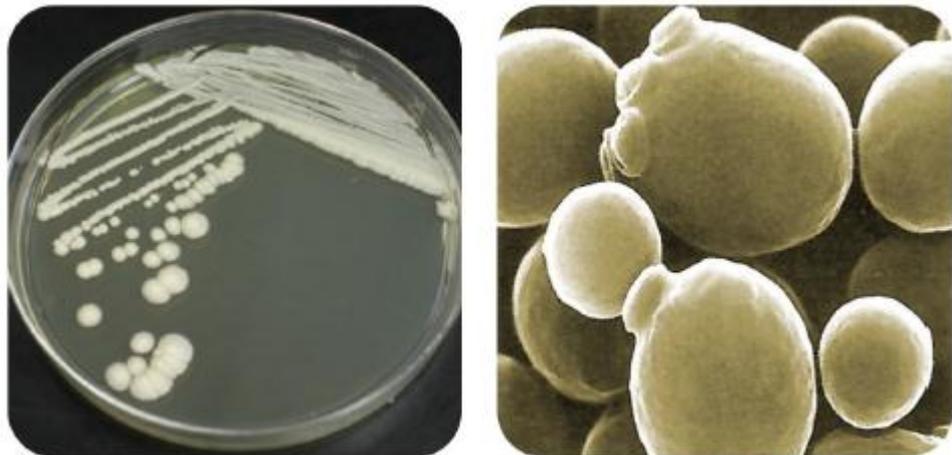
diversidade de morfologia cromossômica e ser considerado como um teste de baixo custo (RAJESHWARI et al., 2016; TEDESCO e LAUGHINGHOUSE IV, 2012).

Na investigação de aberrações cromossômicas, cebolas comuns da espécie *A. cepa* constituem sistemas testes bastante adequados para estimar os efeitos nocivos de químicos, em função de suas excelentes condições cromossômicas (ABU; EZEUGWU, 2011). A influência de substâncias genotóxicas pode ser determinada pela análise do tipo e frequências de células com metáfase, anáfase e telófase aberrantes, e também pela determinação de micronúcleos nas células em interfase (EL-SHAHABY et al., 2003).

2.5.3 Linhagens de *Saccharomyces cerevisiae*

Por serem organismos eucariontes unicelulares simples, de fácil manuseio, fácil cultivo e rápida multiplicação celular, as leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* são padronizadas como modelos de pesquisa para análise de propriedades tóxicas e/ou oxidantes em várias substâncias como medicamentos, extratos e compostos químicos diversos (Figura 03) (HOSTETTER et al., 2012).

Figura 03: leveduras de *Saccharomyces cerevisiae* em cultura bem como sua visualização em microscópio de varredura.



Fonte: ZIRPEL et al., 2015.

A *Saccharomyces cerevisiae* tem sido amplamente utilizada como modelo eucariótico no estudo da elucidação de mecanismos metabólicos, por conta da semelhança da sua maquinaria celular e dos processos metabólicos desempenhados pela levedura, e da fácil manipulação genética (KARATHIA et al., 2011; GONZALEZ-PEREZ et al., 2005; TONGUL; TARHAN, 2016). Além disso, existe uma grande semelhança entre o sistema de

defesas antioxidantes da levedura e o sistema de eucariotos superiores (GIANNATTASIO et al., 2013). Por este motivo, o modelo biológico de *S. cerevisiae* tem sido amplamente utilizado em estudos do mecanismo de resposta celular a condições de estresse, como também do perfil oxidante/oxidativo de diversos compostos naturais e sintéticos (AZAD et al., 2013; HÖFERL et al., 2014; ODRIOZOLA-SERRANO et al., 2016).

No teste de *S. cerevisiae* são utilizadas linhagens proficientes ou mutadas em suas defesas antioxidantes, comumente utilizadas na avaliação da atividade de compostos, naturais ou sintéticos, frente aos mecanismos de defesa antioxidante destes organismos. Tendo em vista que a existência de enzimas antioxidantes são funcionalmente semelhantes à de humanos, a extrapolação de resultados comparativos quanto a segurança na liberação do uso de fármacos ou alimentos e a consolidação de protocolos terapêuticos torna-se mais eficaz (OLIVEIRA et al., 2014).

REFERÊNCIAS

- ABU, N.E.; MBA, K. Mutagenicity testing of pharmaceutical effluents on *Allium cepa* root tip meristems, *Journal of Toxicology and Environmental Health Sciences*, Nsukka, Nigeria, 2012, n.1, p.44-51, dez. 2012.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, Referência bibliográfica de documentos eletrônicos. Disponível em <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 13 de Outubro de 2017.
- ANTUNES, L. M. G.; ARAÚJO, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista de Nutrição*, Campinas, SP, 2000, n.2, p. 81-88, ago. 2000.
- ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria 540. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/> Acesso em 13/10/2017.
- ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Considerações sobre o corante amarelo tartrazina. Informe Técnico nº. 30, de 24 de julho de 2007. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/30_240707.htm>. Acesso em: 05 de agosto de 2017.
- AZAD, G. K.; SINGH, V. TOMAR, R. S. Assessment of the Biological Pathways Targeted by Isocyanate Using N-Succinimidyl N-Methylcarbamate in Budding Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS ONE*, 2014, n. 3, mar. 2014.
- BAGATINI, M. D.; DA SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. *Revis brasileira de farmacognosia*, João Pessoa, PB, 2007, n.3, p. 444-447, Sept. 2007.
- BEAUDOUIN, E. et al. Food anaphylaxis following ingestion of carmine. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1995, n.1, p. 427-430, mai. 1995.
- BOLEY, N. P. et al.. Determination of synthetic colours in food using high performance liquid. *Chromatogr. Anal.*1980, n. 1, p. 589-593, 1980.
- CAPITÁN-VALLVEY , L. F.; NAVAS, N.; AVIDAD, R.; ORBE, I.; BERZAS NEVADO, J. J. Simultaneous determination of colorant mixtures used in cosmetics by Partial Least-Squares Multivariate Calibration Spectrophotometry. *Analytical Sciences*, 1998, n. 1, p.493-496, 1998.
- CARBALLO, J. L.; HERNÁNDEZ-INDA, Z. L.; PÉREZ, P.; GARCÍA-GRÁVALOS, M. D. A comparison between two brine shrimp assays to detect in vitro cytotoxicity in marine natural products. *BMC biotechnology*, 2002, n. 1, p. 17, set. 2002.
- CHUNG KT, FULK GE, EGAN M. Reduction of Azo Dyes by Intestinal Anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology*. 1978, n. 1, p. 558 – 620, Mar. 1978.

CHUNG, K. T. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutat. Res.* 1978, n. 114. p. 269-281. Abr. 1983.

CLYDESDALE, F.M. Color as a factor in food choice, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* Boca Raton, 1993, n.1, p.83-101, 1993.

CRH. HANSEN. Disponível em: <http://www.Crh-ansen.com.br/servlet/contentserver?pagename=brazil%2fcontent2%contentc&c=content&cid=110>. Acesso em: 10 de agosto de 2017.

DOWNHAM, A.; COLLINS, P. Colouring our food in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci.Technolo.* 2000, n. 1, p. 5-22, fev. 2000.

DÜSMAN, E. et al. Principais agentes mutagênicos e carcinogênicos de exposição humana. *SaBios: Revista de Saúde e Biologia*, Maringá, PR, 2012, n.2, p.66-81, ago. 2012.

Elhkim MO, Héraud F, Bemrah N, Gauchard F, Lorino T, Lambré C, et al. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine: an update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regul Toxicol Pharmacol* 2007, n. 1, p. 16 – 308, abr.2007.

EL-SHAHABY, O.; MIGID, H. M. A.; SOLIMAN, M.; MASHALY, I. Genotoxicity screening of industrial wastewater using the Allium chromosome aberration assay. *Pakistan Journal of Biological Sciences.* 2003, n. 1, p. 23-28, 2003.

FIRBAS, P.; AMON, T. Allium chromosome aberration test for evaluation effect of cleaning municipal water with Constructed Wetland (CW) in Sveti Tomaž, Slovenia. *J Bioremed Biodegrad*, 2013, n. 4, p. 189-193, mai. 2013.

FISKESJÖ, GEIRID. Allium test II: Assessment of a chemical's genotoxic potential by recording aberrations in chromosomes and cell divisions in root tips of *Allium cepa* L. *Environmental Toxicology*, 1994, n. 3, p. 235-241, 1994.

FREITAS VPS, BRÍGIDO BM, MAZON EMAM, MARTINI MH, PASSOS MHCR. Avaliação da qualidade de doces em massa tipo junino. *Hig Aliment.* 2006, n. 1, p. 75-82, 2006.

GIANNATTASIO, S.; GUARAGNELLA, N.; ŽDRALEVICAND, M.; MARRA, E. Molecular mechanisms of *Saccharomyces cerevisiae* stress adaptation and programmed cell death in response to acetic acid. *Frontiers in microbiology*, Bari, Italy, 2013, n. 33, p. 20 – 40, fev. 2013.

GONZÁLEZ, M. J.; MIRANDA-MASSARI, J. R.; MORA, E. M.; GUZMÁN, A.; RIORDAN, N. H.; RIORDAN, H. D.; CASCIARI, J. J.; JACKSON, J. A.; ROMÁN-FRANCO, A. Orthomolecular oncology review: ascorbic acid and cancer 25 years later. *Integrative cancer therapies*, 2005, n. 1, p. 32-44, mar. 2005.

GRISOLIA, C. K. Agrotóxicos: Mutações, Câncer e Reprodução. *Editores UNB*, Brasília, DF, 2005, n. 1, p. 21 – 45, dez. 2005.

HERCEG, Z. Epigenetics and cancer: towards an evaluation of the impact of environmental and dietary factors. *Mutagenesis, Oxford*, v. 22, n. 2, p. 91-103, 2007.

HÖFERL, M.; STOILOVA, I.; SCHMIDT, E.; WANNER, J.; JIROVETZ, L.; TRIFONOVA, D. et al. Chemical Composition and Antioxidant Properties of Juniper Berry (*Juniperus communis* L.) Essential Oil. Action of the Essential Oil on the Antioxidant Protection of *Saccharomyces cerevisiae* Model Organism. *Antioxidants*. 2014, n. 1, p. 81-98, fev. 2014.

HOSTETTER, A. A.; OSBORN, M. F.; DE ROSE, V. J. Characterization of RNA-Pt Adducts Formed from Cisplatin Treatment of *Saccharomyces cerevisiae*. *ACS Chem Biol*, 2012, n. 1, p. 218–225, jan. 2012.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/index.asp?ID=2>> . Acesso em 05 de janeiro de 2017.

INOUE M, IWASAKI M, OTANI T, SASAZUKI S, TSUGANE S. Public awareness of risk factors for cancer among the Japanese general population: a population-based survey. *BMC Public Health*. 2006, n. 1, p. 15-21, jan. 2006

Instituto Nacional de Câncer – INCA, o que é câncer? Disponível em: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em 12/10/2017.

Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional, vol 3. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2003.

Introduction. *Cadernos de Saúde Pública*, v. 23, n. 10, p. 2463-2466, 2007.

KARATHIA, H.; VILAPRINYO, E.; SORRIBAS, A.; ALVES, R. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model Organism: A Comparative Study. *PLoS ONE*, 2011, n. 2, p. 18 – 43, fev. 2011.

LHULLIER, C.; HORTA, P. A; FALKENBERG, M. Avaliação de extratos de macroalgas bênticas do litoral catarinense utilizando o teste de letalidade para *Artemia salina*. *Rev Bras Farmacogn*, 2006, n. 1, p. 158-163, jun. 2006.

LIMAN, R. Genotoxic effects of Bismuth (III) oxide nanoparticles by *Allium* and Comet assay. *Chemosphere*, 2013, n. 2, p. 269-273, set. 2013.

MACKINSKI-Jr, M. Estimates of maximum limits of food colors use in brazil through the danish budget method and the baerand wuertzen-modified method. *Food Addit. Contami.*, 1998, n 4, p. 481-486, 1998.

MEYER, B. N.; FERRIGNI, N. R.; PUTNAM, J. E.; JACOBSEN, L. B.; NICHOLS, D. J.; MCLAUGHLIN, J. L. Brine shrimp: a convenient general bioassay for active plant constituents. *Planta medica*, 1982, n. 05, p. 31-34, 1982.

Ministério da Saúde; Mensagem aos médicos. Câncer Fundamentos, Secretária de Assistência Médica-Divisão Nacional de Câncer. Brasília, DF, 1971, n. 1, p. 7-47, 1971.

- MOUTINHO ILS, BERTGES LC, ASSIS RVC. Prolonged use of food dye tartrazine (FD&C yellow n°5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Braz J Biol.* 2007; n. 1, p. 67 – 141, 2007.
- ODRIOZOLA-SERRANO, I.; PUIGPINÓS, J.; OMS OLIU, G.; HERRERO, E.; MARTÍN-BELLOSO, O. Antioxidant activity of thermal or non-thermally treated strawberry and mango juices by *Saccharomyces cerevisiae* growth based assays. *Food Science and Technology.* 2016, n. 1, p. 55–61, 2016.
- OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; DE ALENCAR, M.V.O.B.; GOMES-JÚNIOR, A.L.; SOUZA, A.A.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidante capacity of the aqueous extract of *Cynarascolymus* L. (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology.* 2014, n. 5, p. 136-147, 2014.
- PARRA, A. L.; YHEBRA, R. S.; SARDIÑAS, I. G.; BUELA, L. I. Comparative study of the assay of *Artemia salina* L. and the estimate of the medium lethal dose (LD50 value) in mice, to determine oral acute toxicity of plant extracts. *Phytomedicine*, 2001, n. 5, p. 395-400, set. 2001.
- PISANI P, BRAY F, PARKIN DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer.* 2002, n. 1, p. 72 – 81, Jan. 2002.
- PISANI P. BURDEN of cancer in developing countries. In: Pearce N, Matos E, Vainio H, Boffetta P, Kogevinas M, editors. Occupational cancer in developing countries. *Lyon: IARC;* 1994, n. 1, p. 9 – 31, 1994.
- POLÔNIO MLP, PERES F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cad Saude Publica.* 2009, n. 1, p. 25-66, 2009.
- PRADO MA, GODOY HT. Corantes artificiais em alimentos. *Alim Nutr.* 2003, n. 1, p. 50 – 237, 2003.
- RAJESHWARI, A.; ROY, B.; CHANDRASEKARAN, N.; MUKHERJEE, A. Cytogenetic evaluation of gold nanorods using *Allium cepa* test. *Plant Physiology et Biochemistry*, 2016, n. 109, p. 209-219, 2016.
- RUIZ, A. L. T. G.; MAGALHÃES, E. G.; MAGALHÃES, A. F.; FARIA, A. D.; AMARAL, M. C. E.; SERRANO, D. R.; ZANOTTI-MAGALHÃES, E. M.; MAGALHÃES, L. A. Avaliação da atividade tóxica em *Artemia salina* e *Biomphalaria glabrata* de extratos de quatro espécies do gênero *Eleocharis* (Cyperaceae). *Rev Bras Farmacogn.* João Pessoa, PB, 2005, n. 1, p. 98-102, jun. 2005.
- SAMPAIO, C. Riscos do corante tartrazina em alimentos e medicamentos. Disponível em: <http://www.saudeemmovimento.com.br/reportagem/noticia_frame.asp?cod_noticia=1452>. Acessado em: 13 de outubro de 2017.
- SANDHI MB, PINHEIRO ARO, SICHIERI R, MONTEIRO CA, FILHO MB, SCHIMIDT MI. Análise da Estratégia Global para Alimentação, Atividade Física e Saúde, da Organização Mundial da Saúde. *Epidemiol Serv Saúde*, 2005, n. 1, p. 41-68, mar. 2005.

- SASAKI YF, KAWAGUCHI S, KAMAYA A, OHSHITA M, KABASAWA K, IWAMA K, et al. The comet with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res.* 2002, n. 1, p. 19 – 103, 2002.
- SCHVASTSMAN S. Aditivos alimentares. *Pediat.* 1982, n. 1, p. 10-202, 1982.
- SOUSA, L.R. associação do palmitato de retinol e ácido ascórbico frente aos danos toxicogénicos de antineoplásicos em diferentes sistemas testes, Teresina, PI, 2017, n.1, p. 22 - 40, ago. 2017.
- SPENCE, R. A. J.; JONHSTON, P. G. Em Oncology; Jonhston, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132; Chabner, B. A.; Longo, D. L. Em Cancer chemotherapy and biotherapy; 2a. ed., *Lippincott-Raven*: Filadélfia, 1996.
- SYEED, N. HUSSAIN, F AND SIDDIQI, MA. Role if ATM IVS10-6T→G Polymorphism in Breast Cancer; A Case-control Study in High-risk Kashmiri Population. *Carcinogenesis & Mutagenesis.* 2014, n. 1, p. 15-50, 2014.
- TEDESCO, S. B.; LAUGHINGHOUSE IV, H. D. Bioindicator of genotoxicity: the *Allium cepa* test. *Intech Open Access Publisher*, 2012, n. 1, p. 23 – 52, 2012.
- TONGUL, B.; L. TARHAN. Oxidant and antioxidant status in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to antifungal ketoconazole. *Process Biochemistry*, 2016, n. 1, p. 21 – 42, 2016 .
- WATERS WF. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. *J Community Health.* 2001, n. 1, p. 79-92, Apr. 2001.
- WILSON BG, BAHNA SL. Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005, n. 1, p. 499-507, 2005.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica.* 2002, n. 1, p. 70 – 366, nov. 2002.
- ZIRPEL, B. STEHLE, F. KAYSER, O. Production of Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid from cannabigerolic acid by whole cells of *Pichia (Komagataella) pastoris* expressing Δ^9 -tetrahydrocannabinolic acid synthase from *Cannabis satival*. *Biotechnology Letters.* 2015, n. 1, p. 1869–1875. 2015.

Este trabalho foi elaborado de acordo com as normas da revista *International Journal of Toxicology*. Fator de impacto: 1.205. Link de submissão: <http://journals.sagepub.com/doi/full/10.1177/1091581817736712>.

1 ARTIGO CIENTÍFICO

Efeitos toxicogénéticos do aditivo alimentar Tartrazina em estudos *in vitro* utilizando diferentes células eucarióticas

Jailson Rodrigues dos Santos¹; Larissa de Sousa Soares¹; Bruno Moreira Soares²; Marlene de Gomes Farias¹; Flávio Augusto Costa Vieira e Silva¹; Felipe Cavalcanti Carneiro da Silva^{1,3}; Ana Paula Peron^{1,4}; Ana Carolina Landim Pacheco⁵; Márcia Maria Mendes Marques⁵; João Marcelo de Castro e Sousa^{1,*}.

¹ Laboratório de Citogenética e Mutagênese da Universidade Federal do Piauí. Brasil

² Laboratório de Citogenética Humana e Centro de Pesquisa em Oncologia da Universidade Federal do Pará, Brasil.

³ Laboratório de Citogenética e Mutagênese. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Piauí. Brasil.

⁴ Laboratório de Citogenética e Mutagênese. Programa de Pós-Graduação em Genética e Melhoramento da Universidade Federal do Piauí. Brasil.

⁵ Laboratório de Parasitologia e ecologia de doenças negligenciadas. Universidade Federal do Piauí.

RESUMO

De todos os aditivos utilizados na indústria alimentícia mundial, os corantes são os mais genotóxicos. A tartrazina é um corante alimentar liberado para comercialização no qual possui estudos sobre seus efeitos genotóxicos, citotóxicos e mutagênicos ainda controversos e, em alguns casos, insatisfatórios. Assim, este trabalho avaliou a potencial citotóxico e mutagênico desse corante alimentar em estudos *in vitro*. Os bioensaios utilizados foram o teste de brometo de 3- (4,5-dimetil-2-tiazolil) -2,5-difenil-2H-tetrazólio (MTT), teste de letalidade com *Artemia salina*, teste de *Allium cepa* e teste oxidante em *Saccharomyces cerevisiae*. Diferentes concentrações do corante com diferentes tempos de exposições foram utilizados. Os resultados demonstraram que a tartrazina possui efeitos tóxicos em células animais e vegetais, além de apresentarem citotoxicidade em células de estômago normais humanas. Ademais, mostrou-se mutagenicidade com capacidade de causar clastogenia e distúrbios de fuso mitótico. Porém, seus efeitos toxicogénéticos não estão relacionados com a atividade oxidante. Esses dados demonstram que a tartrazina pode ser prejudicial à saúde e seu uso prolongado pode desencadear a carcinogênese.

Palavras-chave: Aditivo alimentar, citotoxicidade, mutagenicidade, carcinogênese.

1.1 Introdução

É evidente a importância dos aditivos alimentares sob o ponto de vista tecnológico na produção de alimentos. Porém, é necessário estar sempre atento aos possíveis riscos toxicológicos que podem ser acarretados pela ingestão frequente dessas substâncias (Polônio, 2010). Distintas pesquisas têm mostrado reações tóxicas incididas pelos aditivos alimentares, quer seja aguda ou crônica, que desencadearam processos alérgicos, alterações neurocomportamentais e, em longo prazo, neoplasias (Guimarães, 2010). Ainda são poucos os estudos de consumo de aditivos alimentares, fato de grande importância para realização de pesquisas para avaliação da ingestão dessas substâncias e dos seus possíveis efeitos toxicogênicos e deletérios que esses aditivos possam causar a nível celular.

Os corantes artificiais pertencem a uma das classes de aditivos alimentares e têm sido objeto de muitas críticas, que seu uso em muitos alimentos justifica-se apenas por questões de hábitos alimentares (Piasini et al., 2014). Ainda existem diferentes opiniões quanto à inocuidade dos diversos corantes artificiais (Prado e Godoy, 2007). Os mesmos são considerados os aditivos mais genotóxicos existentes (Tawfek et al., 2015), principalmente os pertencentes ao grupo “Azo”, um derivado nitroso capaz de ocasionar reações de hipersensibilidade e tem sido foco de estudos de mutagênese e carcinogênese por produzir, após ser metabolizado pela microflora intestinal, aminas aromáticas e ácido sulfanílico, compostos com alto potencial cancerígeno para células humanas (Freitas, 2012).

Dentre os corantes “azo”, a Tartrazina (TRZ) tem enfoque maior para os toxicologistas e alergistas, sendo relacionada com várias reações adversas, desenvolvendo urticária, asma náuseas, eczema, bronquite, renite, broncoespasmos e dor de cabeça (Khayyat et al., 2017). No entanto, é um dos corantes mais aplicados em alimentos sendo permitido em países desenvolvidos, como Canadá, Estados Unidos e União Européia (Chequer et al., 2011). Esse corante sintético é comumente usado para produtos alimentares os quais são consumidos diariamente (Mittal, Kurup e Mittal, 2007). Entre os alimentos que contêm tartrazina estão os refrigerantes e bebidas desportivas, batatas aromatizadas, molhos, sorvetes, geléias e gomas de mascar. A Tartrazina também é encontrada em muitos consumíveis não alimentares, como sabões, cosméticos, shampoos, vitaminas e certos medicamentos prescritos (Amin, Abdelhameid e Abdelsttar, 2010). Ademais, é usado em muitos países em desenvolvimento como uma alternativa de baixo custo para o açafrão na culinária (Mehedi et al., 2009).

Vários corantes foram avaliados quanto aos seus efeitos toxicogênicos e muitos mostraram resultados significantes para citotoxicidade e mutagenicidade, tais como, azul

brilhante e vermelho 40 (Oliveira et al., 2013); Amaranto (Anastásio et al., 2016); corante Green S (Antunes e Araújo, 2000); bem como a própria Tartrazina (Soares et al., 2015; Şekeroglu et al., 2017; Joshi e Katti, 2017). Entretanto, em alguns estudos *in vivo*, onde os animais receberam Tartrazina em diferentes doses não foi demonstrado alterações citotóxicas nos tecidos e órgãos nem o desenvolvimento de alterações neoplásicas em animais experimentais (Bastaki et al., 2017). Por isso, especificamente para o corante em questão, os estudos permanecem inconclusivos em relação aos seus efeitos toxicogénicos e concentrações viáveis.

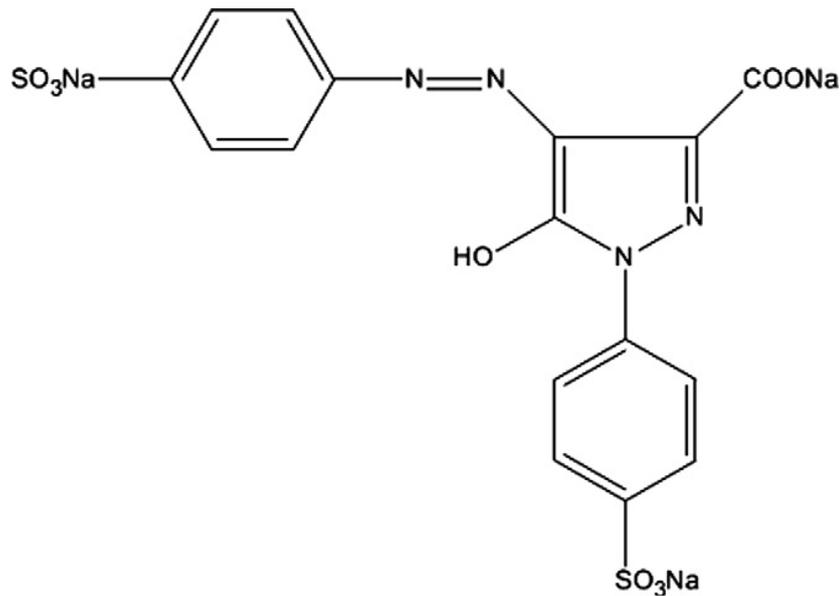
Sob o ponto de vista tecnológico, os aditivos assumem papel importante na produção de alimentos. No entanto, deve haver uma preocupação permanente no que se refere aos riscos toxicológicos provocados pela ingestão diária e indiscriminada dessas substâncias (Polônio e Peres, 2009). Assim, considerando o elevado uso do corante Tartrazina por parte da população, principalmente por crianças (Anastásio et al., 2016), a escassez de estudos conclusivos sobre a genotoxicidade desse corante e a necessidade constante de estudos toxicológicos com aditivos alimentares, o presente estudo teve por objetivo avaliar o potencial citotóxico e mutagênico do corante alimentar Tartrazina em diferentes células eucariotes.

1.2 Material e métodos

1.2.1 Obtenção do aditivo alimentar e definições de concentrações

A Tartrazina (Figura 01) em pó (CAS 1934-21-0, pureza $\geq 85\%$) foi adquirida na Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, EUA). A mesma, foi diluída em água destilada. De acordo com a Joint Expert Committee on Food Additives (JECFA) as quantidades permitidas nos alimentos variam para os diferentes produtos. Para as bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas, é permitida a utilização de Tartrazina na quantidade máxima de 150 $\mu\text{g/ml}$. O mesmo valor é o permitido para pó para preparo de bebidas não alcoólicas gaseificadas e não gaseificadas. Assim, utilizou-se as seguintes concentrações: 0,4 mM (213,72 $\mu\text{g/ml}$); 0,2 mM (106,86 $\mu\text{g/ml}$) e 0,1 mM (53,42 $\mu\text{g/ml}$) para avaliação citotóxica e mutagênica.

Figura 01: Estrutura química do corante alimentar Tartrazina



Fonte: Mpountoukas et al., 2010

1.2.2 Ensaio Citotóxico de MTT

1.2.2.1 Cultivo das células

As células da linhagem de estômago normal MN01 foram cultivadas em garrafas para cultura de células em meio DMEM, suplementados com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibióticos (penicilina/estreptomicina), mantidas em estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. Diariamente, foi acompanhado o crescimento celular com a utilização do microscópio de inversão. O meio foi trocado sempre que o crescimento celular atingiu a confluência necessária para a renovação dos nutrientes ou para realização dos experimentos. Para a manutenção das células, o meio contido na garrafa foi desprezado, as células foram lavadas com PBS 1x e adicionado tripsina durante 5 minutos para que as células que formam uma monocamada soltem da parede da garrafa, em seguida a tripsina foi inativada com o meio de cultura, as células foram removidas e então adicionado o novo meio a garrafa.

1.2.2.2 Procedimento experimental

As células foram semeadas em placas de 96 poços com 3×10^3 células/poço (100 µL/poço) e mantidas na estufa com atmosfera de 5% de CO₂ a 37°C. O Tartrazina e o quimioterápico que estavam em uma solução estoque de 10 mg/mL foram diluídos em meio DMEM para obtenção de uma solução mãe de 100 µg/ml. A partir desta solução foram realizadas diluições seriadas em triplicata e foram adicionadas na placa de 96 poços (100

$\mu\text{L}/\text{poço}$). A doxorubicina foi utilizada como controle positivo e o controle negativo foi o não tratado. Após um período de incubação de 72h, o sobrenadante das células foi aspirado, adicionado 100 μL de solução de MTT (0,5 mg/mL em meio DMEM) e a placa foi reincubada na estufa a 5% de CO_2 por 3h. Em seguida, o sobrenadante foi removido e a placa foi mantida em temperatura ambiente protegida da luz por 24 horas. Então, foi adicionado 100 $\mu\text{L}/\text{poço}$ de DMSO e agitado por 10 minutos até a completa dissolução dos cristais de formazan. As placas foram lidas no espectrofotômetro de placa a um comprimento de onda de 570 nm.

A análise foi realizada através do percentual de inibição x log da concentração, determinadas suas CL_{50} e seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%) a partir de regressão não-linear, utilizando o programa Prisma versão 7.0 (GraphPad Software). A análise da atividade citotóxica da Tartrazina foi realizada na linhagem de estômago normal MN01.

1.2.3 Bioensaio de letalidade em *Artemia salina* (BSLB)

Para a preparação da *A. salina*, os cistos do microcrustáceo foram adquiridos no mercado central de Teresina-PI, Brasil. Esta foi uma rápida modificação do método descrito por Meyer et. al. (1982). Foram incubados cistos do microcrustáceo (*Artemia salina*) em becker contendo uma mistura 50:50 de solução salina (água do mar artificial: 23,0 g de NaCl, 11,0 g de $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 4 g de Na_2SO_4 , 1,3 g de $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0,7 g de KCl em 1 L de água destilada e ajustado para pH 8,5 utilizando Na_2CO_3 , 1N) e água mineral sob arejamento constante durante 48 h a $27 \pm 3^\circ \text{C}$. Após incubação, os náuplios ativos livres de conchas do microcrustáceo foram recolhidos a partir da porção mais iluminada da câmara de incubação e utilizados para o ensaio. Dez náuplios foram retirados por meio de uma pipeta de Pasteur e inseridos em cada tubo de ensaio contendo 4,5 mL da solução salina. O experimento foi realizado por diluições seriadas, onde a concentração inicial da Tartrazina foi de 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Em cada experimento, adicionou-se 0,5 mL da amostra teste a 4,5 mL de solução de salina, mantendo a mesma temperatura de eclosão, sob a luz, os náuplios sobreviventes foram contados. Foram utilizados três tubos para cada tratamento. A mortalidade de *A. salina* foi contada após 48h de exposição à substância testada.

A definição da toxicidade do extrato foi baseado nas escalas de toxicidade de McLaughlin et al. (1993), de acordo com a escala, os valores de concentração letal (CL_{50}) > 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ considerou-se não tóxico; entre 500 a 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ considerou-se baixa

toxicidade; moderada toxicidade para CL_{50} entre 100 a 500 $\mu\text{g/ml}$ e, finalmente, muito tóxico quando a CL_{50} foi inferior 100 $\mu\text{g/ml}$.

1.2.4 Obtenção das células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

Para o teste de ponta de raiz de *Allium cepa*, foram utilizados bulbos de tamanho pequeno, uniforme, de mesma origem, não germinadas e saudáveis. Os bulbos de cebola foram colocados em frascos com água, a temperatura ambiente, para enraizar. Quando as raízes atingiram 0,5 cm foram colocadas nas soluções de tratamento. Para verificar a atividade citotóxica e mutagênica dos compostos estudados, foram realizados cinco tratamentos com cinco repetições cada: T1 – controle negativo-CN, onde as raízes dos bulbos foram tratadas com água destilada; T2 – 0,4 mM de Tartrazina; T3 - 0,2 mM de Tartrazina; T4 - 0,1 mM de Tartrazina e T5 – Controle positivo (CP) tratados com sulfato de cobre (0,0006 mg/ml). Os bulbos ficaram submersos nos tratamentos durante os tempos de exposição de 24 e 72 horas. Foi observado em cada um desses tempos de exposição (TE) o crescimento de duas raízes selecionadas em cada um dos bulbos, através da medição com o auxílio de uma régua como medida de toxicidade.

1.2.4.1 Preparo, leitura das lâminas e análise citogenética para o teste *A. cepa*

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram preparadas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002), e analisadas em microscópio óptico em objetiva de 40x. Para cada bulbo, analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada tratamento. Foram observadas células em intérfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Calculou-se o número de células em intérfase e em divisão de cada controle e tempo de exposição, e em seguida foi determinado o índice de divisão celular ou índice mitótico (IM) para avaliação do efeito citotóxico. Avaliou-se também a ação mutagênica dos extratos por meio do número de células com alterações cromossômicas (AC): micronúcleos, metáfases colchícinicas, pontes nucleoplasmáticas, quebras, perdas e atrasos cromossômicos.

1.2.5 Linhagens de leveduras utilizadas

Seis linhagens de leveduras foram utilizadas para avaliar a atividade oxidante do corante alimentar. A linhagem selvagem utilizada não apresentava nenhuma mutação nas enzimas de defesa contra substâncias oxidativas, enquanto que as outras cinco linhagens

selecionadas apresentavam defeitos em pelo menos uma enzima antioxidativa. A linhagem EG118 é mutada na enzima superóxido dismutase citoplasmática (CuZnSOD – produto do gene SOD1), a EG110 é mutada na SOD mitocondrial (MnSOD – produto do gene SOD2); a EG133 possui uma mutação em duas enzimas a SOD1 e SOD2; a EG223 mutada em CAT1 e EG mutada em SOD1 e CAT1 (Tabela 01).

Tabela 01. As linhagens de levedura *S. cerevisiae* que foram utilizadas no estudo.

DESCRIÇÃO	GENÓTIPO	ORIGEM
EG103 (SODWT)	MATa leu2-3,112 trp1-289 ura3-52 GAL+	Edith Gralla, L Angeles
EG118 (Sod1Δ)	sod1:URA3 todos os outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG110 (Sod2Δ)	sod2:TRP1 todos outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG133 (Sod1ΔSod2Δ)	sod1:URA3 sod2:TRP1 duplo mutante/todos outros marcadores como EG103	Edith Gralla, L Angeles
EG223 (Cat1Δ)	EG103, exceto cat1:TRP1	Edith Gralla, L Angeles
EG (Sod1ΔCat1Δ)	EG103, exceto sod:URA3 e cat1:TRP1	Edith Gralla, L Angeles

Fonte: Adaptado de Oliveira et al., 2014.

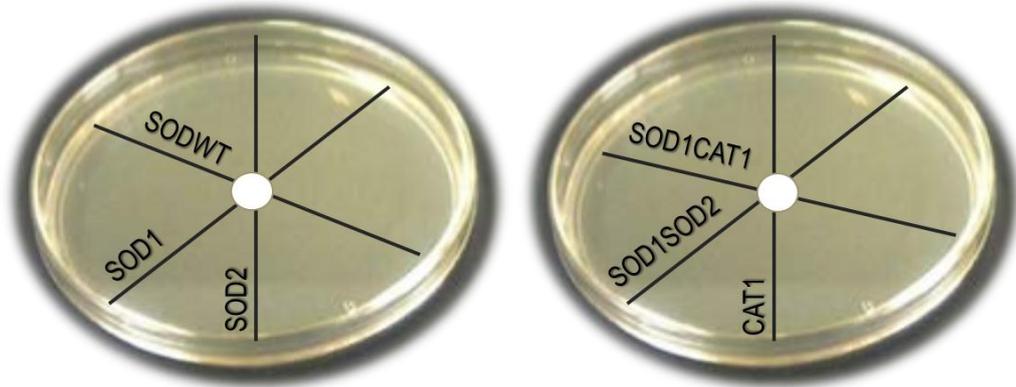
1.2.5.1 Capacidade oxidante em células de leveduras *Saccharomyces cerevisiae*

Todos os experimentos foram realizados através do teste do disco central em *S. cerevisiae*, onde as culturas de leveduras foram distribuídas sobre a técnica de tratamento com a adição de Tartrazina em diferentes concentrações. As linhagens foram cultivadas em meio YEL (extrato de levedura 0,5%, 2% de Bacto-peptona, 2% de glucose) a 28°C em um agitador orbital até atingirem a fase de crescimento estacionária, de acordo com Oliveira e colaboradores (2014). Células em suspensão foram semeadas a partir do centro para a margem das placas de Petri em um movimento contínuo, para ambos os lados da placa, contendo em seu centro um disco de papel de filtro estéril, ao qual foi acrescentado, nas distintas placas, 10 µL das diferentes concentrações de Tartrazina (Figura 02). Para correlação estatística com os resultados dos grupos testes, dois grupos controle foram utilizados sendo 10 µL de uma solução contendo peróxido de hidrogênio H₂O₂ (10 mMol) utilizado como controle positivo e 10 µL de solução salina (0,9%), como controle negativo.

Após 48 h de incubação em estufa a 34 °C, os halos de inibição de crescimento das linhagens, em milímetros, foram mensurados desde a margem do disco de papel-filtro até o início do crescimento celular. Os valores tabelados e submetidos à análise estatística variaram

de 0 mm (crescimento completo) a 40 mm (ausência de crescimento), que corresponde à medida do raio da placa de Petri. Todos os testes foram realizados em duplicata.

Figura 02: Semeio das linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* para determinação do potencial oxidante de compostos.



1.2.6 Análise estatística

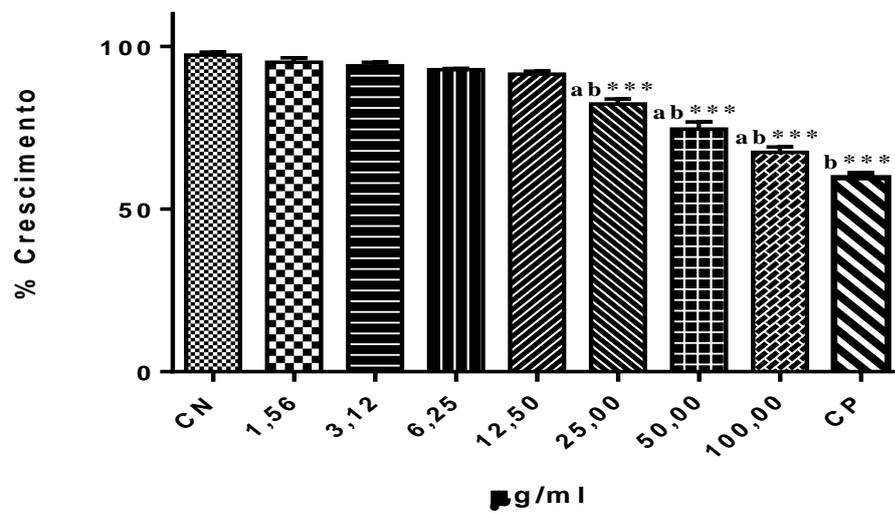
Os resultados foram considerados significantes a partir de $p < 0,05$; $p < 0,01$; $p < 0,001$. Foram aplicados a Análise de variância (one-way e two-way ANOVA) e Tukey como *post hoc* teste, por meio do programa GraphPad Prism versão 7.00 para Windows, (GraphPad Software, San Diego California USA).

1.3 Resultados

1.3.1 Avaliação da citotoxicidade por ensaio MTT

O corante tartrazina nas concentrações de 25 a 100 $\mu\text{g/ml}$ apresentou efeitos citotóxicos estatisticamente significantes ($p > 0,001$) quando comparado com o controle negativo. O cálculo do seu CI_{50} ficou acima de 100 $\mu\text{g/ml}$. Mostrando assim que este aditivo em exposição a células normais de estomago humano é potencialmente tóxico (Figura 3).

Figura 03: Porcentagem da viabilidade celular da linhagem estomacal normal MN01 exposta a diferentes concentrações de tartrazina.

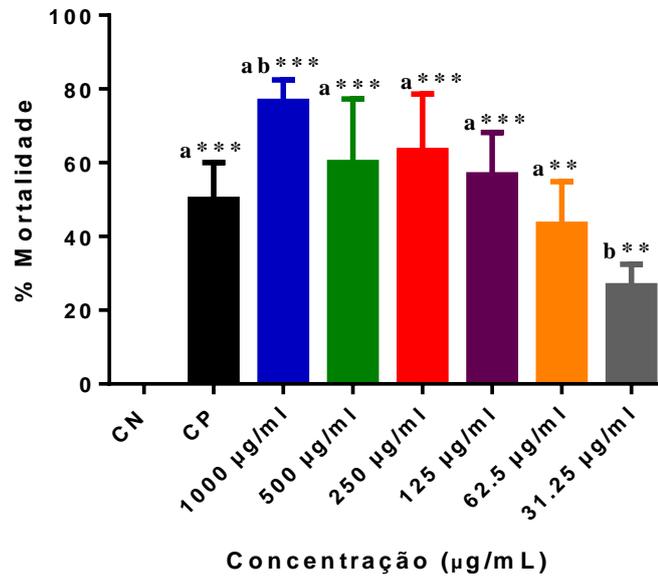


Valores são as médias e desvio padrão, ^a comparado com o CN, ^b comparado com o CP (doxorubicina, 16 µM); *** p<0,001. Anova one-way, com pós-teste de Tukey.

1.3.2 Toxicidade do corante Tartazina

O corante avaliado nas concentrações de 62,5 a 1000 µg/ml apresentaram os maiores índices de letalidade, tendo valores estatisticamente significantes em relação ao CN ($p < 0,01$ e $p < 0,001$) para o tempo de exposição analisado (48 h). O valor de CL_{50} foi de: 221,5 µg/ml, sendo o mesmo superior ao valor preconizado pela ANVISA e JECFA, porém com valores estatisticamente tóxicos (62,5 e 125 µg/ml) inferiores ao permitido (150 µg/ml) por esses órgãos. Utilizando a classificação de toxicidade de McLaughlin et al. (1993), a Tartrazina apresentou moderada toxicidade (100 a 500 µg/ml) (Figura 4).

Figura 04: Atividade tóxica do corante Tartazina em diferentes concentrações ($\mu\text{g/ml}$) por meio do Bioensaio de Letalidade em *Artemia salina* (BSLB) utilizando o tempo de exposição de 48hs.



CL_{50} ($\mu\text{g/ml}$)	221,5
IC	129,0 – 380,6
r^2	0,89

Valores são as médias e desvio padrão, ^acomparado com o CN, ^bcomparado com o CP (KDCr, 16 μM); ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ Anova oneway, com pós teste de Tukey. Cada concentração foi executada com três tubos (10 náuplios vivos / tubo); CL_{50} : Concentração letal 50% em $\mu\text{g/ml}$. IC: Intervalo de confiança; r^2 : Determinação de coeficiente.

1.3.3 Avaliação tóxica e citotóxica do aditivo alimentar Tartrazina

A caracterização toxicogenética do corante avaliado foi realizado por parâmetros macroscópicos: tamanho das raízes (TR) e citogenéticos: índice mitótico (IM) e alterações cromossômicas (AC). Diferenças estatisticamente significantes para TR e IM para todas as concentrações e tempos de exposição (TE) foram observadas em comparação ao controle negativo (CN), indicando efeitos tóxicos e citotóxicos do corante, respectivamente (Tabela 02). Porém, quando comparado ao controle positivo (CP), as concentrações testadas mostraram valores estatisticamente superiores para as duas variáveis (TR e IM).

Possivelmente, a citotoxicidade do corante causou parada de divisão celular nas células meristemáticas de *Allium cepa*. Isso foi observado quando as fases do ciclo celular foram avaliadas estatisticamente, nesse caso, as três concentrações nos TE de 24 e 72 h apresentaram uma maior quantidade de células em intérfase e uma menor quantidade de células em prófase ($p < 0,05$) quando comparados ao CN (Tabela 02).

Tabela 02: Efeito tóxico e citotóxico da Tartrazina em células meristemáticas de *Allium cepa*. One-way ANOVA com pós-teste de Tukey. Valores de significância, ^a: comparado ao controle negativo (CN); ^b: comparado ao Controle positivo (CP). $p < 0,05$.

Fases do ciclo celular									
Tratamento	Concentração	TE (hora)	TR (mm)	Intérfase	Prófase	Metáfase	Anáfase	Telófase	IM (%)
CN	-		25,5 ± 2,8	476,2 ± 12,39	423,8 ± 7,85	41,0 ± 1,6	30,7 ± 2,6	28,2 ± 2,8	52,3 ± 1,51
CP	0,006 mg/ml		11,7 ± 0,5 ^a	842,1 ± 12,2 ^a	100,0 ± 13,9 ^a	26,75 ± 4,0 ^a	17,2 ± 2,5	14,0 ± 1,9 ^a	15,8 ± 1,1 ^a
Tartrazina	0,4 mg/ml	24h	15,0 ± 1,4 ^{ab}	703,75 ± 56,3 ^{ab}	259 ± 68,1 ^{ab}	10,75 ± 0,9 ^{ab}	12,5 ± 0,5 ^a	14,0 ± 2,1 ^a	29,6 ± 7,1 ^{ab}
	0,2 mg/ml		16,0 ± 0,8 ^{ab}	665,1 ± 73,9 ^{ab}	297,2 ± 56,4 ^{ab}	14,8 ± 1,4 ^a	10,4 ± 1,7 ^{ab}	12,5 ± 1,9 ^a	33,4 ± 7,7 ^{ab}
	0,1 mg/ml		16,1 ± 0,6 ^{ab}	700,1 ± 48,7 ^{ab}	252,25 ± 34,4 ^{ab}	16,6 ± 1,9 ^a	15,6 ± 1, ^a	15,25 ± 0,9 ^a	30,1 ± 6,5 ^{ab}
CN	-		36,2 ± 3,5	487,5 ± 12,3	412,5 ± 7,8	41,0 ± 1,63	30,7 ± 2,6	28,2 ± 2,8	51,2 ± 1,2
CP	0,006 mg/ml		14,5 ± 0,5 ^a	873 ± 15,1 ^a	65,0 ± 15,7 ^a	29,7 ± 6,0	19,2 ± 3,6	14,0 ± 2,4 ^a	12,8 ± 1,3 ^a
Tartrazina	0,4 mg/ml	72h	19,8 ± 2,3 ^{ab}	652,8 ± 74,3 ^{ab}	316,0 ± 58,1 ^{ab}	11,5 ± 0,9 ^a	10,5 ± 0,5 ^a	9,2 ± 2,16 ^a	34,7 ± 10,5 ^{ab}
	0,2 mg/ml		18,5 ± 1,2 ^{ab}	678,2 ± 63,9 ^{ab}	280,4 ± 46,4 ^{ab}	16,8 ± 1,9 ^a	13,2 ± 2,1 ^{ab}	11,4 ± 2,9 ^a	32,1 ± 5,6 ^{ab}
	0,1 mg/ml		23,2 ± 0,9 ^{ab}	648,0 ± 88,7 ^{ab}	300,7 ± 34,4 ^{ab}	20,5 ± 2,0 ^a	15,8 ± 1,7 ^a	14,2 ± 1,1 ^a	35,1 ± 8,8 ^{ab}

Média ± DP. TE: Tempo de exposição; TR: Tamanho de raiz em milímetro (mm); IM: Índice mitótico.

1.3.4 Avaliação mutagênica do aditivo alimentar Tartrazina

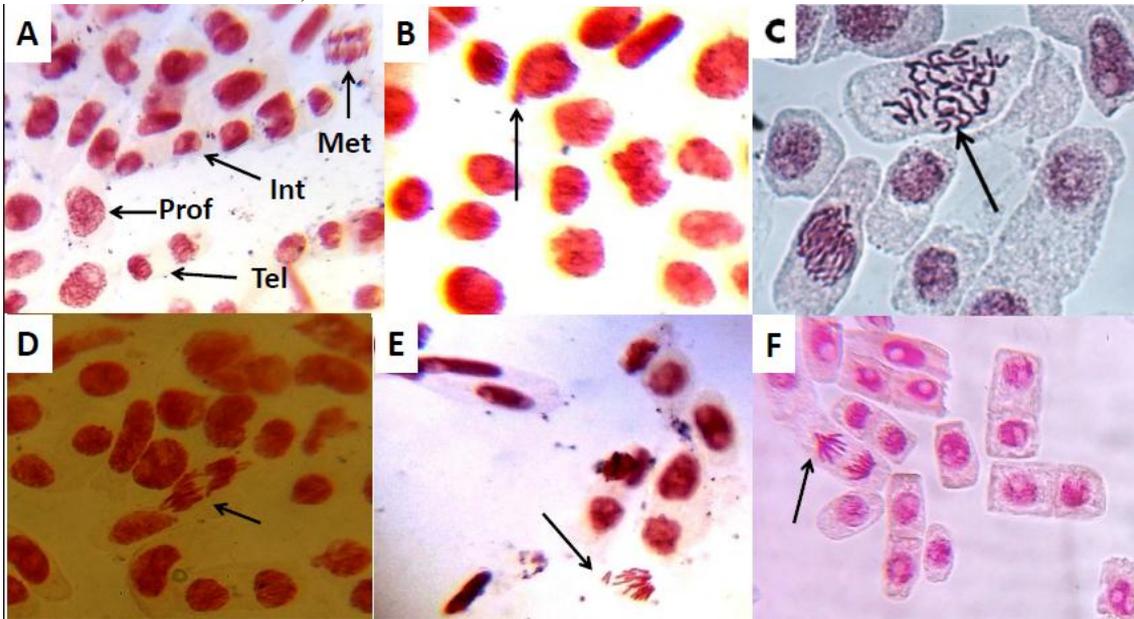
Em relação à avaliação mutagênica, todas as concentrações do corante apresentaram mutagenicidade estatisticamente significativa para os 02 TE avaliados quando comparados ao CN no referido bioensaio. Porém, com efeitos mutagênicos menores quando comparados ao CP ($p < 0,05$). Avaliando por tipo de dano genético (Figura 05), o corante apresentou capacidade clastogênica mostrado pelos valores significantes de MN na maior concentração (0,4mM), bem como a capacidade de causar distúrbios no fuso mitótico devido aos valores significantes observados para o tipo de dano c-metáfase nas concentrações avaliadas quando comparados ao CN (Tabela 03).

Tabela 03: Efeito mutagênico da Tartrazina em células meristemáticas de *Allium cepa*. Two-way ANOVA e pós-teste de Tukey. Valores de significância, ^a: comparado ao controle negativo (CN); ^b: comparado ao Controle positivo (CP). $p < 0,05$.

Tratamento	Concentração	TE	Tipos de alterações cromossômicas (AC)				Total de AC	
			Micronúcleos	c-metáfases	Pontes	Cromossomos soltos		Atrasos
CN	-		0,2 ± 0,5	0,2 ± 0,5	0,25 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,75 ± 0,5	1,40 ± 0,5
CP	0,006 mg/ml		3,8 ± 0,9 ^a	4,5 ± 0,5 ^a	10,2 ± 0,9 ^a	5,25 ± 2,62 ^a	10,5 ± 1,29 ^a	34,25 ± 4,7 ^a
Tartrazina	0,4 mg/ml	24hs	3,0 ± 0,9 ^a	6 ± 4,1 ^a	1,5 ± 1,2 ^b	0,75 ± 0,5 ^b	2,5 ± 1,29 ^b	15,04 ± 4,2 ^{ab}
	0,2 mg/ml		2,3 ± 0,9	6 ± 4,1 ^a	1,0 ± 2,0 ^b	7,0 ± 7,52 ^a	0,5 ± 1,0 ^b	16,75 ± 4,3 ^{ab}
	0,1 mg/ml		2,2 ± 2,0	4,5 ± 1,7 ^a	1,0 ± 1,41 ^b	0,75 ± 0,95 ^b	0,75 ± 0,95 ^b	9,2 ± 3,5 ^{ab}
CN	-		0,2 ± 0,5	0,15 ± 0,5	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,5	0,4 ± 0,3	0,9 ± 0,3
CP	0,006 mg/ml		4,2 ± 0,7 ^a	4,9 ± 0,4 ^a	12,3 ± 1,2 ^a	7,2 ± 1,9 ^a	11,4 ± 0,9 ^a	40,05 ± 4,9 ^a
Tartrazina	0,4 mg/ml	72hs	4,0 ± 3,1 ^a	2,5 ± 1,2	2 ± 1,4 ^b	0,25 ± 0,5 ^b	2,0 ± 2,4 ^b	10,75 ± 2,5 ^{ab}
	0,2 mg/ml		2,7 ± 1,2	4,25 ± 3,0 ^a	0,5 ± 0,5 ^b	0,75 ± 0,5 ^b	0,7 ± 1,5 ^b	9,0 ± 2,2 ^{ab}
	0,1 mg/ml		2,0 ± 1,41	3,5 ± 1,9 ^a	1,0 ± 1,1 ^b	1,0 ± 2,0 ^b	1,2 ± 1,8 ^b	8,75 ± 1,2 ^{ab}

Média ± DP. TE: Tempo de exposição; AC: Alterações cromossômicas.

Figura 05: Perfil fotomicrográfico das células meristemáticas de *Allium cepa* tratados com o corante alimentar Tartrazina. Coloração com orceína acética e aumento de 400X ao microscópio óptico. A: células em diferentes fases do ciclo celular; B: MN em prófase; C: c-metáfase; D: Ponte cromossômica em anáfase; E: perda cromossômica em metáfase; F: atraso cromossômica em anáfase.



1.3.5 Avaliação da capacidade oxidante de Tartrazina

O aditivo alimentar nas concentrações analisadas (0,4; 0,2 e 0,1 mM) não apresentou nenhum efeito oxidante nas linhagens de leveduras deficientes em enzimas antioxidantes. Mostrando, assim, que nessas concentrações seus efeitos citotóxicos e mutagênicos observados no presente estudo não se deve ao estresse oxidante pelo aumento de radicais livres (Tabela 04).

Tabela 04: Avaliação oxidante do aditivo alimentar Tartrazina em diferentes concentrações utilizando linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* mutadas em enzimas antioxidantes. Dados obtidos pela inibição de crescimento em placas (0-40 mm).

Linhagens	Tratamentos				
	Salina	H ₂ O ₂	0,4 mM	0,2 mM	0,1 mM
SODWT	0,75 ± 0,50	14,35 ± 0,25 ^a	0,00 ± 0,00	0,30 ± 0,50	0,00 ± 0,00
Sod1Δ	1,50 ± 0,57	14,73 ± 2,28 ^a	1,00 ± 0,80	0,80 ± 0,80	0,00 ± 0,00
Sod2Δ	1,25 ± 0,50	13,82 ± 0,45 ^a	0,50 ± 0,57	0,75 ± 0,89	0,00 ± 0,00
Sod1Sod2Δ	2,00 ± 0,81	11,35 ± 1,01 ^a	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00
CatΔ	1,25 ± 0,50	15,10 ± 0,70 ^a	1,00 ± 0,80	0,75 ± 0,50	0,00 ± 0,00
Sod1Cat	1,50 ± 0,57	12,37 ± 0,22 ^a	0,10 ± 1,15	0,75 ± 0,90	0,00 ± 0,00

Os valores correspondem a Média ± Desvio padrão das medidas dos halos de inibição de crescimento das linhagens. ANOVA-one-way e pós-teste de Tukey. Valores de significância para ^a p<0.001 comparado à salina, ^b p<0.001 comparado à H₂O₂.

1.4 Discussão

Os corantes artificiais costumam ser usados para melhorar a aparência dos alimentos e possibilitar uma maior tabela de cores. Porém, alguns destes corantes aparecem na literatura médica, como causadores potenciais de doenças aos seres humanos (Amchova et al., 2015). A Tartrazina é um exemplo de corante com respaldo legal para uso em todo território nacional, entretanto, vem sendo bastante contestada sobre sua utilização por apresentar potencial alergênico, genotóxico e possivelmente cancerígeno (ANVISA, 2007).

Estudos mais atuais veem buscando uma melhor caracterização dos efeitos adversos que o corante Tartrazina possa vir a desencadear no organismo humano, principalmente a nível molecular. A literatura científica já demonstra estudos acerca do corante tais como os que descrevem suas propriedades tóxicas sistêmicas (Amin et al., 2010), o corante afetando o desenvolvimento corpóreo e metabólico (El-wahab e Moram, 2012), sua capacidade moduladora de receptores hormonais (Axon et al., 2012), a maneira com que ele interage com o DNA (Kashanian e Zeidali, 2011), seus efeitos alergênicos (Matsuo et al., 2013) e finalmente seus efeitos genotóxicos e citotóxicos (Mpountoukas et al., 2010),

No presente estudo, o corante avaliado se mostrou citotóxico e mutagênico colaborando com os resultados de Mpountoukas et al., (2010). Este autor avaliou os efeitos genotóxicos dos corantes Tartrazina, Amaranto e Eritrosina B27 em células sanguíneas periféricas. Igualmente aos outros dois corantes, os pesquisadores evidenciaram que a tartrazina é capaz de alterar significativamente as taxas de divisão mitótica, apresentar citotoxicidade nas concentrações mais elevadas (4,0 e 8,0 mM) além de mostrar alta capacidade de se ligar a estrutura do DNA.

Kashanian e Zeidali (2011) utilizaram o DNA das células do timo de um bezerro a fim de visualizar suas propriedades de ligação com a Tartrazina na concentração de 10 nM e consequentemente seus efeitos adversos ao DNA. Para isso, utilizou-se um espectrofotômetro para obter-se o espectro UV-vis da interação DNA-tartrazina, um viscosímetro para mensurar a viscosidade e um espectropolarímetro para medir o dicroísmo circular. O estudo demonstrou que a interação DNA-tartrazina afetou a estrutura helicoidal do DNA, além de evidenciar uma maior facilidade de ligação da Tartrazina com o DNA desnaturado. Notou-se também uma pequena alteração na viscosidade do DNA ligado à Tartrazina, e uma alteração no espectro de dicroísmo circular, atestando assim, os danos ao DNA ocasionados pelo aditivo. Entre os vários sistemas enzimáticos responsáveis pelos processos metabólicos as principais rotas de biotransformação de corantes azo, como a Tartrazina, envolve citocromo P-450. As enzimas

P-450 pertencem a uma superfamília de heme proteínas que estão presentes em todos os organismos vivos. Estão envolvidas no metabolismo de uma ampla variedade de compostos químicos e possuem a capacidade de catalizar reações oxidativas e redutivas de xenobióticos (Gonzalez, 2005).

A redução de corantes azo pode ocorrer no fígado, via citocromo P-450, gerando produtos com propriedades carcinogênicas, tais como aminas aromáticas. A toxicidade e carcinogenicidade de certos corantes azos em mamíferos também é discutida após reações de biotransformação catalisadas por reações enzimáticas, incluindo as catalisadas por azoreductase presente no intestino dos mamíferos. Os produtos gerados podem ser mais ou menos tóxicos que a molécula original (Kim et al., 2005).

Corantes azos, portanto, com estruturas químicas com grupos amino, alquilamino ou acetilamino, sem nenhum grupo sulfonado são ainda mais propensos à intensa ação de um metabolismo oxidativo formando espécies radicalares. Como consequência pode-se formar compostos com alta potencialidade mutagênica ou carcinogênica devido às interações com grupos nucleofílicos das bases nitrogenadas presentes no DNA, mudança de polaridade, ou alteração na lipossolubilidade (Ferraz, 2008).

O corante em questão, além dos seus efeitos citotóxicos e genotóxicos a nível celular, também apresentou no presente estudo efeitos tóxicos significantes como demonstrado no ensaio de *Artemia salina*. Esses resultados vão ao encontro dos observados por Amin et al., (2010). Que avaliaram os efeitos sistêmicos tóxicos do corante Tartrazina, especificamente nos biomarcadores do estresse oxidativo em órgãos como rim e fígado em *Rattus norvegicus* utilizando as concentrações de 15 mg/Kg e 500 mg/Kg. Após o período exposição, os autores concluíram que a ingestão de concentrações altas ou baixas de Tartrazina altera as concentrações totais de colesterol, proteínas sanguíneas e as atividades enzimáticas. Além disso, os níveis séricos de creatinina, albumina plasmática, ureia e globulina foram aumentados o que demonstra a toxicidade desse corante nos órgãos analisados.

É notório, pelo presente estudo, que a tartrazina tem um efeito direto sobre o DNA em diferentes células, inclusive em células humanas, bem como observado também no trabalho de Soares et al., (2015) com linfócitos humana. Ademais, a ingestão deste corante expõe as células do epitélio gastrointestinal, induzindo um aumento no dano do DNA, como observado por Sasaki et al. (2002) na sua experiência *in vivo*. Portanto, acumulação sucessiva de danos provocada pela ingestão habitual de alimentos que contém esse corante, pode levar ao surgimento de mutações, muitas vezes associadas ao aparecimento de doenças, como o câncer.

1.5 Conclusão

O corante artificial Tartrazina apresentou ação tóxica, citotóxica e mutagênica em células vegetais, animais e humanas, porém seus efeitos adversos ao DNA não puderam ser explicados pelo aumento do estresse oxidativo a nível celular. Estudos adicionais focados nos mecanismos de ação tóxica desse corante devem ser encorajados e realizados.

1.6 Referências

Agência nacional de vigilância sanitária, Referência bibliográfica de documentos eletrônicos. <http://www.anvisa.gov.br>. Acesso em 13 de Outubro de 2017.

Almeida, J.R.C de - Farmacêuticos em Oncologia - Uma Nova Realidade. *São Paulo: Atheneu*, 2004; 356-359.

Amchova P, Kotolova H, Ruda-Kucerova J. Health safety issues of synthetic food colorants. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2015;-1016(10): 09-026.

Amin KA, Hameid HA, Elsttar AHA, Effect of food azo dyes tartrazine and carmoisine on biochemical parameters related to renal, hepatic function and oxidative stress biomarkers in young male rats. *Food and Chemical Toxicology*, 2010; -48: 2994-2999.

Anastácio, L. B. Corantes Alimentícios Amarantho, Eritrosina B e Tartrazina, e seus possíveis Efeitos Maléficos à Saúde Humana. *Academia*. 2016; 1: 24 – 27.

Antunes, L. M. G.; Araújo, M. C. P. Mutagenicidade e antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. *Revista de Nutrição*. 2000; 13 (2): 81-88.

ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária, Portaria 540. <http://www.anvisa.gov.br/> acessado em 13/10/2017.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Considerações sobre o corante amarelo tartrazina. Informe Técnico nº. 30, de 24 de julho de 2007. http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/30_240707.htm>. Acesso em: 05 de janeiro de 2017.

Aun, M. V.; Mafara, C.; Philippi, J. K.; Agondi, R. C.; Motta, A. A. Aditivos em alimentos. *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia*. 2011; -34(5): 177 – 186.

Australian Bureau of Statistics. Causes of death, Australia, 1997. ABS Catalogue. Belconnen: *Australian Bureau of Statistics*; 1999; 3303 (0) 20-45.

Axon A, May, FEB, Gaughan LE, Williams FM, Blain PG, Wright MC. Tartrazine and sunset yellow are xenoestrogens in a new screening assay to identify modulators of human oestrogen receptor transcriptional activity. *Toxicology*, 2012; -298:40-51.

- Beaudouin, E. et al. Food anaphylaxis following ingestion of carmine. *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 1995; 74: 427-430.
- Boley, N. P. et al.. Determination of synthetic colours in food using high performance liquid. *Chromatogr. Anal.*1980; 105: 589-593.
- Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Informe Técnico nº. 30, de 24 de julho de 2007. http://www.anvisa.gov.br/alimentos/informes/30_240707.htm Acesso em: 31/09/2017.
- Capitán-vallvey , L. F.; Navas, N.; Avidad, R.; Orbe, I.; Berzas Nevado, J. J. Simultaneous determination of colorant mixtures used in cosmetics by Partial Least-Squares Multivariate Calibration Spectrophotometry. *Analytical Sciences.* 1998; 13: 493-496.
- Casé, F.; Deliza, R.; Rosenthal, A.; Mantovani, D.; Felberg, I. Produção de “leite” de soja enriquecido com Cálcio. *Ciência e Tecnologia de Alimentos.* 2005; 25 (1): 86-91.
- Chung KT, Fulk GE, Egan M. Reduction of Azo Dyes by Intestinal Anaerobes. *Applied and Environmental Microbiology.* 1978: 558-62.
- CHUNG, K. T. The significance of azo-reduction in the mutagenesis and carcinogenesis of azo dyes. *Mutat. Res.* 1983; 114: 269-281.
- Clydesdale, F.M. Color as a factor in food choice, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*1993; 33 (1), 83-101.
- Comparação da mutagenicidade dos azo corantes Disperse Red 1, Disperse Orange 13 e Disperse Red 13 utilizando o teste de mutagenicidade *Salmonella*. [file:///C:/Users/Jailson/Downloads/dissertacaosimplificada%20\(1\).pdf](file:///C:/Users/Jailson/Downloads/dissertacaosimplificada%20(1).pdf) Acesso: 12/10/2017. 2008: 1-21.
- Dall’agnol, R. P. A Alimentícios No Brasil/ The Utilization Of Artificial Colorings In Alimentary Products In Brazil. In: Simpósio Internacional de Inovação Tecnológica. *Simtec*, 2013;-4: 26-37.
- Dall’agnol, R. P. A Utilização De Corantes Artificiais Em Produtos 405 Revista da Universidade Vale do Rio Verde, *Três Corações*, 2015; 13 (1): 397-407.
- Di Lorenzo, G. et al. Urinary metabolites of histamine and leukotrienes before and after placebo-controlled challenge with ASA and food additives in chronic urticarial patients. *Allergy*, 2002; 57 (12): 1180-1186.
- Doguc DK, Ceyhan BM, Ozturk M, Gultekin F. Effects of maternally exposed colouring food additives on cognitive performance in rats. *Toxicology and Industrial Health*, 2012; 29(7): 616-623.
- Downham, A.; Collins, P. Colouring our food in the last and next millennium. *Int. J. Food Sci.Technolo.* 2000; 35: 5-22.

- Drake, J. J.. A Scientific status summary by the Institute of Food Technologists' expert panel of food safety and nutrition and the Comite of Public Information, *IFT Food Colours*. 1986: 24-50.
- Elhkim, M. O.; Héraud, F.; Bemrah, N.; Gauchard, F.; Lorino, T.; Lambré, C., et al. New considerations regarding the risk assessment on Tartrazine: an update toxicological assessment, intolerance reactions and maximum theoretical daily intake in France. *Regul Toxicol Pharmacol*. 2007; 47: 308-316.
- El-Wahab HMFA, Moram GSE. Toxic effects of some synthetic food colorants and/or flavor additives on male rats. *Toxicology and Industrial Health*, 2012, 29(2): 224-232.
- Fennema, O.R. Química de alimentos. *Artmed*, 2010; 4: 800-900.
- Gonzalez, F. J. Role of cytochromes P450 in chemical toxicity and oxidative stress: studies with CYP2E1. Mutation Research, Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. *Hindawi*. 2005; 569 (1/2): 101-110.
- Gouveia, F. Indústria de alimentos: no caminho da inovação e de novos produtos. *Inovação Uniemp*. 2006; 2 (5): 8-20.
- Guimarães, N.M.C.P. Perturbação de Hiperatividade e Défice de Atenção – para além da genética. 2010. 31f. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina), Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar – *Universidade do Porto, Porto*, 2010; 09-20.
- Hamerski L, Rezende MJC, Silva BV. Usando as Cores da Natureza para Atender aos Desejos do Consumidor: Substâncias Naturais como Corantes na Indústria Alimentícia. *Revista Virtual em Química*, 2013, 5(3): 394-420.
- Inca 2017. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/prevencao-fatores-de-risco/alimentacao>. Acesso em: 06/10/2017.
- Instituto Nacional de Câncer – INCA, o que é câncer: http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322. Acesso em 12/10/2017.
- Instituto Nacional de Câncer; Ministério da Saúde. Câncer no Brasil: dados dos registros de base populacional, vol 3. Rio de Janeiro (Brasil): INCA; 2003.
- Kashanian S, Zeidali SH. DNA Binding Studies of Tartrazine Food Additive. *DNA and Cell Biology*, 2011;-30(7): 499-505.
- Kim, G. Y. et al. Electroenzymatic degradation of azo dye using an immobilized peroxidase enzyme. *Journal of Hazardous Materials*, 2005; 126 (1/3), 183-188.
- Machado, F. C. S. Reprodutibilidade e validade de um questionário de frequência alimentar baseado em grupos de alimentos, em população adulta da Região Metropolitana de Porto Alegre, RS. *RDBU Repositório Digital da Biblioteca de Unisinos*. 2010:16-52.
- Mackinski-Jr, M. Estimates of maximum limits of food colors use in brazil through the danish budget method and the baerand wuertzen-modified method. *Food Addit. Contami*.1998; 15(4): 481-486.

Matsuo H, Yokooji T, Morita H, Ooi M, Urata K, Ishii K, Takahagi S, Yanase Y, Hiragun T, Mihara S, Hide M. Aspirin Augments IgE Mediated Histamine Release from Human Peripheral Basophils via Syk Kinase Activation. *Allergology International*, 2013; -62: 503-511.

Medeiros, Fernanda J. Manual de sobrevivência para nutrição clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009; 20-30.

Ministério da Saúde; Mensagem aos médicos. Câncer Fundamentos, Secretária de Assistência Médica-Divisão Nacional de Câncer; 1971: 7-47.

Moutinho, I. L. S.; Bertges, L. C.; Assis, R. V. C. Prolonged use of food dye tartrazine (FD&C yellow nº5) and its effects on the gastric mucosa of Wistar rats. *Brazilian Journal of Biology*. 2007; 67 (1): 5-141.

Mpountoukas P, Pantazaki A, Kostareli E, Christodoulou P, Kareli D, Poliliou S, Mourelatos C, Lambropoulou V, Lialiaris T. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. *Food and Chemical Toxicology*, 2010; -48: 2934-2944.

OLIVEIRA, G. L. S.; OLIVEIRA, F.R.A.M.; DE ALENCAR, M.V.O.B.; GOMES-JÚNIOR, A.L.; SOUZA, A.A.; MELO-CAVALCANTE, A.A.C.; FREITAS, R.M. Evaluation of antioxidante capacity of the aqueous extract of *Cynarascolum L.* (Asteraceae) in vitro and in *Saccharomyces cerevisiae*. *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*. 2014, n. 5, p. 136-147, 2014.

Pan X, Qin P, Liu R, Wang J. Characterizing the Interaction between Tartrazine and Two Serum Albumins by a Hybrid Spectroscopic Approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2011, 59: 6650-6656.

Peres, F.; Polônio, M. L. T. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para saúde pública brasileira. *Cadernos de Saúde Pública*. 2009; 25 (8): 6-16.

Pisani P, Bray F, Parkin DM. Estimates of the world-wide prevalence of cancer for 25 sites in the adult population. *Int J Cancer*. 2002; -97(1): 72-81.

Pisani P. Burden of cancer in developing countries. In: Pearce N, Matos E, Vainio H, Boffetta P, Kogevinas M, editors. Occupational cancer in developing countries. Lyon: IARC Scientific Publications. 1994; 129: 31-9.

Polônio MLP, Peres F. Consumo de aditivos alimentares e efeitos à saúde: desafios para a saúde pública brasileira. *Cad Saude Publica*. 2009; 25(8): 66-165.

Polônio, M. L. T. Percepção de mães quanto aos riscos à saúde de seus filhos em relação ao consumo de aditivos alimentares: o caso dos pré-escolares do Município de Mesquita. 2010. 129f. Tese (Doutorado em Ciências na área de Saúde Pública e Meio Ambiente). *Fiocrus*, 2010; 23 – 100.

Prado MA, Godoy HT. Corantes artificiais em alimentos. *Alim Nutr*. 2003;1 4(2):237-50.

Prado MA, Godoy HT. Teores de corantes artificiais em alimentos determinados por cromatografia líquida de alta eficiência. *Revista Química Nova*. 2007; 30(2): 268-273.
Riedel, G. Controle sanitário dos alimentos, *Loyola*, 1987; -4: 440-446.

Sampaio, C. Riscos do corante tartrazina em alimentos e medicamentos.
http://www.saudeemmovimento.com.br/reportagem/noticia_frame.asp?cod_noticia=1452.2004>. Acessado em: 13 de outubro de 2017.

Sasaki YF, Kawaguchi S, Kamaya A, Ohshita M, Kabasawa K, Iwama K, et al. The comet with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutat Res*. 2002; 519:103-19.

Sasaki, Y. F.; Kawaguchi, S.; Kamaya, A.; Ohshita, M.; Kabasawa, K.; Iwama, K.; Taniguchi, K.; Tsuda, S. The comet with 8 mouse organs: results with 39 currently used food additives. *Mutation Research*, 2002;-51 (9): 103-109.

Schvastsman S. Aditivos alimentares. *Pediatr*. 1982; 4: 10-202.

Sousa, L.R. Associação do palmitato de retinol e ácido ascórbico frente aos danos toxicogênicos de antineoplásicos em diferentes sistemas testes. (Dissertação). *Universidade Federal do Piauí*. 2017: 24-160.

Spence, R. A. J.; Jonhston, P. G. Em *Oncology*; Jonhston, P. G., ed; Oxford University Press: Oxford, 2001, p. 1-14, 121-132; Chabner, B. A.; Longo, D. L. Em *Cancer chemotherapy and biotherapy*; 2a. ed., Lippincott-Raven: Filadélfia, 1996.

Syed, N. Hussain, F and Siddiqi, MA. Role if ATM IVS10-6T→G Polymorphism in Breast Cancer; A Case-control Study in High-risk Kashmiri Population. *Carcinogenesis & Mutagenesis*. 2014; 05: 17-45.

Veras, R. Forum. Population aging and health information from the National Household Sample Survey: contemporary demands and challenges. Introduction. *Cadernos de Saúde Pública*. 2007; 23 (10), 2463-2466.

Waters WF. Globalization, socioeconomic restructuring, and community health. *J Community Health*. 2001; 26(2):79-92.

Wilson BG, Bahna SL. Adverse reactions to food additives. *Ann Allergy Asthma Immunol* 2005; 95: 499-507.

World Health Organization. Policies and managerial guidelines for national cancer control programs. *Rev Panam Salud Publica*. 2002 ;-12(5): 366-70.

ANEXO



International Journal of Toxicology

2016 Impact Factor: 1.205

2016 Ranking: 213/256 in Pharmacology & Pharmacy | 86/92 in Toxicology

Source: 2016 Journal Citation Reports® (Clarivate Analytics, 2017); Indexed in PubMed: MEDLINE

Published in Association with [American College of Toxicology](#)

Editor

[Mary Beth Genter, PhD](#) University of Cincinnati, USA

Other Titles in:

[Toxicology](#) | [Toxicology \(Clinical\)](#)

eISSN: 1092874X | ISSN: 10915818 | Current volume: 36 | Current issue: 5 Frequency: Bi-monthly

[Download flyer](#) [Recommend to Library](#)

- [Description](#)
- [Aims and Scope](#)
- [Editorial Board](#)
- [Abstracting / Indexing](#)
- [Submission Guidelines](#)

Average time from submission to first decision: 13 days

The *International Journal of Toxicology* publishes timely, peer-reviewed papers on current topics important to toxicologists. Six bi-monthly issues cover a wide range of topics, including contemporary issues in toxicology, safety assessments, novel approaches to toxicological testing, mechanisms of toxicity, biomarkers, and risk assessment. The Journal also publishes invited reviews on contemporary topics, and features articles based on symposia. In addition, supplemental issues are routinely published on various special topics, including three supplements devoted to contributions from the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel.

All authors are now required to complete an authorship form upon submission of their article. Any author found not to be in compliance with the [Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals](#) formulated by the International Committee on Medical Journal Editors (ICJME) and requirements for authorship will be relisted under acknowledgements.

This journal is a member of the [Committee on Publication Ethics](#).

There are no fees associated with submitting to this journal.

Please read the guidelines below then submit your manuscripts electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/uito>. Authors will be asked to set up an online account in the SAGETRACK system, powered by ScholarOne. Please note that manuscripts not conforming to these guidelines may be returned. Only manuscripts of sufficient quality that meet the aims and scopes of *IJT* will be reviewed. For questions regarding submission, contact Mary Beth Genter, Editor, at gentermb@ucmail.uc.edu.

As part of the submission process you will be required to warrant that you are submitting your original work, that you have the rights in the work, that you are submitting the work for first publication in the Journal and that it is not being considered for publication elsewhere and has not already been published elsewhere, and that you have obtained and can supply all necessary permissions for the reproduction of any copyright works not owned by you.

Manuscript Submission Guidelines

Article Types:

International Journal of Toxicology (the Journal) is the official journal of the American College of Toxicology and is published by SAGE. The Journal publishes timely, peer-reviewed original research papers on current topics important to toxicologists. Six bi-monthly issues cover a wide range of topics, including contemporary issues in toxicology, safety assessments, novel approaches to toxicological testing, mechanisms of toxicity, biomarkers, and risk assessment. The Journal also publishes invited reviews on contemporary topics, and features articles based on symposia. In addition, supplemental issues are routinely published on various special topics, including three supplements devoted to contributions from the Cosmetic Ingredient Review Expert Panel.

The Journal does NOT publish the following: case reports, case studies, papers dealing with chemoprotection/therapeutic interventions (i.e. the protective/therapeutic effect of agent X against the toxicity of chemical Y), papers showing results with poorly characterized natural products, or papers with an ecotoxicology focus.

Editorial Policies:

Peer review: Manuscripts that meet the journal requirements are peer reviewed by experts from the Journal's Editorial Board or other qualified reviewers. Reviewers are asked to return their peer reviews within three weeks. Guidelines for reviewing manuscripts are posted on the American College of Toxicology's website: <http://www.actox.org/journal/intlJournal.asp>.

Authorship: Papers should only be submitted for consideration after consent is given by all contributing authors. Those submitting papers should carefully check that all those whose work contributed to the paper are acknowledged as contributing authors. We require that author contributions are listed after the COI disclosure. Please note that authorship should conform to guidelines established by the Council on Publication Ethics: <http://publicationethics.org/files/2003pdf12.pdf>. A sample statement is outlined here: “XXX and YYY designed the experiments; XXX, AAA, and BBB performed the experiments; AAA, BBB, and CCC analyzed the data; ZZZ contributed reagents; XXX and CCC wrote the manuscript.” A form is provided on the Manuscript Central submission site to aid authors in outlining the contributions of each author.

Acknowledgements: Acquisition of funding, collection of data, or general supervision of the research group alone does not constitute authorship. Individuals who participated in the research but do not qualify for authorship should be listed in the Acknowledgements section of the manuscript (with the permission of that individual). Individuals who provided writing assistance do not qualify for authorship and should be included in the Acknowledgements section.

Funding: *International Journal of Toxicology* requires all authors to disclose their funding in a consistent fashion under a “Funding” heading. Please see the Funding Acknowledgements page on the SAGE Journal Author Gateway to confirm the format for disclosing funding. If the work was performed without any specific funding, authors should state “This research received no specific grant from any funding agency in the public, commercial, private, or not-for-profit sectors”.

Conflict of Interest (COI) disclosure: *International Journal of Toxicology* requires all authors to disclose any possible conflicts of interest. Sufficient disclosure may include divulging affiliation as members of industrial or governmental organizations, academic support, non-profit consulting, advocacy, and all sources of financial and material support for studies and manuscripts submitted. Please ensure that a “Declaration of Conflicting Interest” statement is included at the end of your manuscript, after the Acknowledgements section and prior to the references. If no COI exists, please state that “The Author(s) declare(s) that there is/are not conflict(s) of interest”.

Research involving human subjects: This work must be conducted with appropriate and competent oversight, such as provided by and Institutional Review Board (IRB), ethics committee (EC), or similar independent organization and must comply with the principles of the Declaration of Helsinki (World Medical Organization; <http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>). The manuscript should state in the Methods section how participants were recruited and whether participants gave informed consent; the IRB or EC approval number must be included. In addition, information must be included in the manuscript that clearly states the number of human subjects recruited and describe the study procedures and data collection techniques. The Editor reserves the right to examine such documentation. No paper will be considered for review and publication without this information from the authors.

Research involving Laboratory animals: Manuscripts submitted to *International Journal of Toxicology* should clearly state their compliance with the guidelines and principles listed therein and should indicate that animal protocols were reviewed and approved by an

institutional panel. The American College of Toxicology Policy on the Use of Animals in Toxicology is published in Issue 1 each year, and copies may be requested from the Editor.

Data sharing: *International Journal of Toxicology* permits authors to share data as Supplemental files available in the online version of the Journal. Authors may also provide detailed information in their articles as to how the data may be obtained. This information should include links to third-party data repositories or detailed contact information for third-party data sources.

Publishing policies: *International Journal of Toxicology* is a member of the Committee on Publication Ethics (COPE). SAGE is committed to upholding the integrity of the academic record. We encourage authors to refer to the Committee on Publication Ethics' [International Standards for Authors](#) and view the Publication Ethics page on the [SAGE Author Gateway](#).

Plagiarism: *International Journal of Toxicology* and SAGE take issues of copyright infringement, plagiarism, or other breaches of best practice in publication very seriously. We seek to protect the rights of our authors and we always investigate claims of plagiarism or misuse of articles published in the journal. Equally, we seek to protect the reputation of the journal against malpractice. Submitted articles may be checked using duplication-checking software. Where an article is found to have plagiarized other work or included third-party copyright material without permission or with insufficient acknowledgement, or where authorship of the article is contested, we reserve the right to take action including, but not limited to: publishing an erratum or corrigendum (correction); retracting the article (removing it from the journal); taking up the matter with the head of department or dean of the author's institution and/or relevant academic bodies or societies; banning the author from publication in the journal or all SAGE journals, or appropriate legal action.

Contributor's publishing agreement: Before publication, SAGE requires the author as the rights holder to sign a Journal Contributor's Publishing Agreement. SAGE's Journal Contributor's Publishing Agreement is an exclusive licence agreement which means that the author retains copyright in the work but grants SAGE the sole and exclusive right and licence to publish for the full legal term of copyright. Exceptions may exist where an assignment of copyright is required or preferred by a proprietor other than SAGE. In this case copyright in the work will be assigned from the author to the society. For more information please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the SAGE Journal Author Gateway.

Open access and author archiving: *International Journal of Toxicology* offers optional open access publishing via the SAGE Choice program. For more information please visit the [SAGE Choice](#) website. For information on funding body compliance, and depositing your article in repositories, please visit [SAGE Publishing Policies](#) on our [Journal Author Gateway](#).

Online repositories and author rights: Authors may not post the accepted version of the article (Version 2) to online repositories (including ResearchGate, Mendeley, etc.) until 12 months after publication of the article in the journal. Authors may not post the published article (Version 3) on a website or in a repository without permission from SAGE. To view your full rights as an author, visit the [SAGE Publishing Policies](#) on the [Journal Author Gateway](#).

Permissions: Authors are responsible for obtaining permission from copyright holders for reproducing any illustrations, tables, figures or lengthy quotations previously published

elsewhere. For further information including guidance on fair dealing for criticism and review, please visit our [Frequently Asked Questions](#) on the [SAGE Journal Author Gateway](#).

Preparing your manuscript

Word processing formats: Preferred formats for the text and tables of your manuscript are Word DOC, RTF, XLS. LaTeX files are also accepted. The text should be double-spaced throughout and with a minimum of 3cm for left and right hand margins and 5cm at head and foot. Text should be standard 10 or 12 point. Word and (La)Tex templates are available on the [Manuscript Submission Guidelines](#) page of our Author Gateway.

Artwork, figures and other graphics: For guidance on the preparation of illustrations, pictures and graphs in electronic format, please visit SAGE's [Manuscript Submission Guidelines](#). Figures will be uploaded as individual files and should meet the following criteria:

300 dpi or higher in resolution.jpg or .tif files

Figures supplied in color will appear in color online regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For specifically requested color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from SAGE after receipt of your accepted article.

Supplementary material: This Journal is able to host additional materials online (e.g. datasets, podcasts, videos, images etc) with the full-text of the article. These will be subjected to peer-review alongside the article. For more information please refer to our guidelines on submitting supplementary files, which can be found within our [Manuscript Submission Guidelines](#) page.

Article layout: *International Journal of Toxicology* follows the American Medical Association (AMA) format for text, citations, and references. Authors submitting manuscripts to *International Journal of Toxicology* should consult the 10th Edition of the AMA Manual of Style.

References must be numbered sequentially in the text, and listed in numerical order at the end of the text.

Typical entry for a journal article:

Brock WJ, Woolley AP, Sugimoto T. Certification in toxicology: an international perspective of risk:benefit. *Int J Toxicol*. 2009;28(3):147-50.

Typical entry for journal article with >6 authors (list first 3, then et al.):

Politano VT, Lewis EM, Hoberman AM, et al. Evaluation of the developmental toxicity of methyl dihydrojasmonate (MJD) in rats. *Int J Toxicol*. 2008;27(3):295-299.

Entry for book chapter:

Baker H, Genter MB. The olfactory system and nasal mucosa as portals of entry of viruses, drugs, and other

exogenous agents into the brain. In: Doty RL, ed. Handbook of Olfaction and Gustation. 2nd ed. New York, NY: Marcel Dekker, Inc; 2003:549.

Submission: The following will be requested during online submission: (a) names, credentials, and complete contact information for the corresponding author; names, credentials, positions, and email addresses for all co-authors; (b) cover letter to the Editor stating explicitly that the manuscript is not under consideration by another journal; (c) abstract of 250 words or less; (d) key words; (e) abbreviations; and (f) one complete, double-spaced Microsoft Word file of the article with the following components listed in order of appearance:

- Abstract
- Main body of the article
 - Introduction
 - Materials and Methods
 - Results
 - Discussion
- Acknowledgements, including source(s) of funding
- Conflict(s) of interest
- Figure legends
- References
- Tables

Please keep in mind that manuscripts will not be reviewed until all necessary information has been submitted. Articles needing extensive improvements in the English presentation will be returned to the Authors for revision. Articles not in the scope of the Journal will be rejected without review. The Editor reserves the right to request original data (including histology slides) for review.

English language editing services: Authors seeking assistance with English language editing, translation, or figure and manuscript formatting to fit the journal's specifications should consider using SAGE Language Services. Visit [SAGE Language Services](#) on our Journal Author Gateway for further information.

Submitting your manuscript:

Manuscripts should be submitted electronically to <http://mc.manuscriptcentral.com/uito>. Authors will be asked to set up an online account in the SAGETRACK system, powered by ScholarOne. For questions regarding submission, contact Mary Beth Genter, Editor-in-Chief at gentermb@ucmail.uc.edu. Hard copy submissions or submissions via email to the Editor will not be acknowledged or reviewed.

IMPORTANT: Please check whether you already have an account in the system before trying to create a new one. If you have reviewed or authored for the Journal in the past, it is likely that you have previously created an account. For further guidance on submitting your manuscript online please visit ScholarOne Online Help.

Title, keywords and abstracts: Please supply a title, short title, an abstract and keywords to accompany your article. The title, keywords and abstract are key to ensuring that readers find

your article online through online search engines such as Google or PubMed. Please refer to the information and guidance on how best to title your article, write your abstract and select your keywords by visiting the SAGE Journal Author Gateway for guidelines on How to Help Readers Find Your Article Online.

Corresponding author contact details: Provide full contact details for the corresponding author including email, mailing address and telephone numbers. Affiliations are required for all co-authors. Invalid email addresses will result in return of manuscripts without review.

Manuscript acceptance and publication:

SAGE Production: Your SAGE Production Editor will keep you informed as to your article's progress throughout the production process. Proofs will be sent by PDF to the corresponding author and should be returned promptly.

Access to your published article: SAGE provides authors with online access to their final article.

Online First publication: Online First allows final revision articles (completed articles in queue for assignment to an upcoming issue) to be published online prior to their inclusion in a final journal issue which significantly reduces the lead time between submission and publication. For more information please visit our Online First Fact Sheet.

Other Information:

Guidelines for manuscripts describing natural products/natural products extracts: *International Journal of Toxicology* receives numerous submissions that focus on natural products or derivatives (most commonly extracts). In order to ensure the scientific reproducibility and quality of these submissions, the following parameters, at a minimum, must be addressed in the manuscript: (a) source and availability of material [including whether wild or cultivated]; (b) selection of material [in the case of plants, the plant selected for collection should be taxonomically the same as recommended by the national pharmacopeia or other related document]; (c) collection of the material; (d) processing and preparation of material; (e) storage conditions of the neat test substance and the dosing formulation; (f) analytic method(s) used to assure stability; (g) phytochemical analysis of the material, or other quantitative analytical evaluation that demonstrates the composition of the material. Include verification of stability and purity of the neat test substance under a verifiable method; (h) dose formulation analysis (e.g. quantitative measurement of homogeneity, stability and dose verification analysis of the test substance in the vehicle during and under the same test conditions as the definitive study). Excellent guidance on preparation and testing of natural products, their extracts, etc. has been detailed by the World Health Organization and the Foundation for Medical Research, India.

Where can authors post their manuscripts? SAGE has adopted RoMEO Green compliant author archiving policy. The following applies under this new policy:

- You retain copyright in your work
- You may do whatever you wish with the version of the article you submitted to the journal (version 1).

- Once the article has been accepted for publication, you may post the accepted version (version 2) of the article on your own personal website, your department's website or the repository of your institution without any restrictions.
- You may not post the accepted version (version 2) of the article in any repository other than those listed above (i.e. you may not deposit in the repository of another institution or a subject repository) until 12 months after publication of the article in the journal.
- You may use the published article (version 3) for your own teaching needs or to supply on an individual basis to research colleagues, provided that such supply is not for commercial purposes.
- You may use the published article (version 3) in a book you write or edit any time after publication in the journal.
- You may not post the published article (version 3) on a website or in a repository without permission from SAGE.
- When posting or re-using the article please provide a link to the appropriate DOI for the published version of the article on SAGE Journals (<http://online.sagepub.com>)



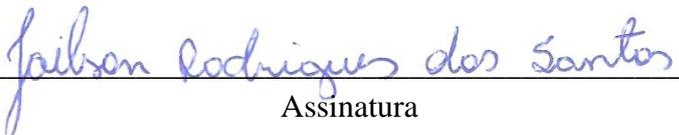
**TERMO DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DIGITAL NA BIBLIOTECA
“JOSÉ ALBANO DE MACEDO”**

Identificação do Tipo de Documento

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

Eu, **Jailson Rodrigues dos Santos**, 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 **Efeitos toxicogenéticos do aditivo alimentar tartrazina em estudos *in vitro* utilizando diferentes células eucarióticas** 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 02 de Março de 2018.


Assinatura