



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

FABELINA KAROLLYNE SILVA DOS SANTOS

**TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE AROMATIZANTES
ALIMENTARES DE HORTELÃ, CANELA E LIMÃO**

PICOS, PIAUÍ

2018

FABELINA KAROLLYNE SILVA DOS SANTOS

**TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE AROMATIZANTES
ALIMENTARES DE HORTELÃ, CANELA E LIMÃO**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Licenciatura Plena em Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí, *Campus* Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do grau de Licenciado em Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Marcia
Maria Mendes Marques

PICOS – PI
Junho de 2018

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

S237t Santos, Fabelina Karollyne Silva dos.
Toxicidade e genotoxicidade de aromatizantes alimentares de hortelã, canela e limão. / Fabelina Karollyne Silva dos Santos. – 2018.

28 f.

CD-ROM : il.; 4 ¼ pol.

Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura Plena em Ciências Biológicas) – Universidade Federal do Piauí, Picos, 2019.

Orientador(A): Prof.^a Dr.^a. Marcia Maria Mendes Marques.

1. Aromatizantes Alimentares. 2. Potencial Tóxico. 3. *Allium cepa*. 4. *Artemia salina*. I. Título.

CDD 581.4

FABELINA KAROLLYNE SILVA DOS SANTOS

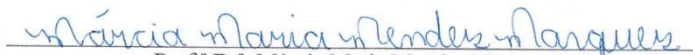
TOXICIDADE E GENOTOXICIDADE DE AROMATIZANTES
ALIMENTARES DE HORTELÃ, CANELA E LIMÃO

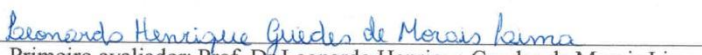
Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Licenciatura
Plena em Ciências Biológicas da
Universidade Federal do Piauí,
Campus Senador Helvídio Nunes de
Barros, como requisito parcial para a
obtenção do grau de Licenciado em
Ciências Biológicas.

Orientador(a): Prof.^a Dr.^a Marcia
Maria Mendes Marques

Aprovado em 29 de Junho de 2018.

BANCA EXAMINADORA


Prof.^a Dr.^a Márcia Maria Mendes Marques
(Orientadora)


Primeiro avaliador: Prof. Dr. Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima
UEPI - CSHNB


Segundo avaliador: Prof.^a Dr.^a Ana Carolina Landim Pacheco
UEPI - CSHNB

DEDICATÓRIA

Dedico ao Senhor, à minha Fonte e Fortaleza.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as graças concedidas, e por ter permitido que eu chegasse até aqui. A minha família, minha base, que sempre me incentivou e me apoiou durante todo tempo, em especial aos meus pais, Otiliano Lourenço e Maria de Jesus Fabelina, que deram todo suporte financeiro e emocional que precisei durante todo o decorrer do curso, aos meus irmãos Fernanda Karyne, Orlando Lourenço e José Edeilson, meus tios Ivaneide Fabelina e José Luiz que sempre estiveram presentes.

À Prof.^a. Dr.^a. Ana Paula Peron, minha imensa gratidão, respeito e admiração. Muito obrigada por tudo, conselhos, experiências, momentos, tenho certeza que a senhora é um presente de Deus em minha vida, Obrigada pela grande contribuição para que este trabalho fosse concluído. Obrigada a Prof.^a. Dr.^a Márcia Maria Mendes Marques por ter aceito o convite de ser minha orientadora.

Agradeço também a Tales Reis Freitas que acompanhou de perto todos os meus momentos bons e ruins. Obrigada por cada risada, cada momento de descontração, por toda amizade, conselhos e ajuda.

E aos amigos que a vida me deu de presente, obrigada, Ila Monize, Maria Eduarda, Valtânia Ana, Afonso Naftali, Rafaela e Lucas Emanuel.

Aos mestres pelos ensinamentos repassados, as dúvidas esclarecidas, contribuíram significativamente para minha formação. Em especial aos professores Mariluce Fonseca Gonçalves, Maria do Socorro Meireles de Deus, Leonardo Henrique Guedes de Moraes Lima e Ana Carolina Landim Pacheco.

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

Mil cairão ao teu lado, e dez mil, a tua direita, mas tu não serás atingido.

(Salmos 91:7)

RESUMO

Avaliou-se a toxicidade de aromatizantes alimentares de hortelã, canela e limão, em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa*, na forma pura (como são comercializados) e nas proporções 1:1; 1:2 e 1:4 (v:v), após 24 e 48 horas de exposição; bem como via teste *Artemia salina*, nas concentrações 1000,0; 500,0; 250,0; 125,0; 62,5; 31,25; 15,62; 7,82 e 3,90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, após 24 horas de exposição. Com base nos resultados obtidos, em raízes observou-se que os três aromatizantes, em todos os tratamentos e tempos de análises considerados, causaram inibição significativa da divisão celular. Porém, não causaram alterações celulares aos meristemas avaliados. As nove concentrações analisadas de cada aditivo promoveram 100% de letalidade dos náuplios avaliados de *A. salina*. Portanto, nas condições de análises estabelecidas para este estudo, os aditivos de hortelã, canela e limão foram significativamente tóxicos aos bioensaios utilizados.

Palavras-chaves: Aditivos de Aroma e Sabor, Potencial Tóxico, *Allium cepa*, *Artemia salina*.

ABSTRACT

Toxicity and genotoxicity of food flavorings of peppermint, cinnamon and lemon were evaluated in meristematic cells of *Allium cepa* roots, in pure form (as marketed) and in 1: 1 ratios; 1: 2 and 1: 4 (v: v) after 24 and 48 hours of exposure; as well as via test *Artemia salina*, in concentrations 1000.0; 500.0; 250.0; 125.0; 62.5; 31.25; 15.62; 7.82 and 3.90 $\mu\text{g}/\text{mL}^{-1}$ after 24 hours of exposure. Based on the results obtained, in roots it was observed that the three flavorings, in all treatments and times of analysis considered, caused significant inhibition of cell division. However, they did not cause cellular alterations to the evaluated meristems. The nine concentrations analyzed of each additive promoted 100% of lethality of the evaluated nauplii of *A. salina*. Therefore, under the conditions of analysis established for this study, the additives of mint, cinnamon and lemon were significantly toxic to the bioassays used.

Key words: Food Additive, Toxic Potential, *Allium cepa*, *Artemia salina*.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. REFERENCIAL TEÓRICO	13
2.1 ADITIVOS ALIMENTARES.....	13
2.2 AROMATIZANTES ALIMENTARES.....	14
2.3 REGULAMENTAÇÕES SOBRE ADITIVOS ALIMENTARES.....	15
2.4 SISTEMA TESTE UTILIZANDO <i>Allium cepa</i>	16
2.5 SISTEMA TESTE UTILIZANDO <i>Artemia salina</i>	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 OBTENÇÃO DOS AROMATIZANTES.....	18
3.2 DETERMINAÇÃO DOS TRATAMENTOS OU CONCENTRAÇÕES.....	18
3.3 AVALIAÇÃO DA TOXICIDADE EM NAÚPLIOS DE <i>A. salina</i>	18
3.4 AVALIAÇÃO DA CITOTOXICIDADE E GENOTOXICIDADE EM CÉLULAS MERISTEMÁTICAS DE RAÍZES DE <i>Allium cepa</i> L.....	19
3.5 PREPARO E LEITURA DAS LÂMINAS.....	19
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	20
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
5. CONCLUSÃO	25
REFERÊNCIAS	26

1 INTRODUÇÃO

Os aditivos ou microingredientes alimentares tornaram-se obrigatórios na alimentação moderna, sobretudo por sua capacidade em manter por longa data a qualidade de alimentos comercializados em supermercados (XU et al., 2013; ADAMI; CONDI, 2016; SALES et al., 2016). Dentre essas substâncias, os aditivos de aroma e sabor têm especial relevância por conferirem ou reforçarem o aroma e o sabor aos mais variados tipos de alimentos industrializados (KONISHI et al., 2011; SALES et al., 2017).

Classificados na indústria como naturais, sintéticos idênticos aos naturais e sintéticos artificiais, os aromatizantes alimentares possuem formulação complexa, constituída por uma variedade de compostos químicos, como diluentes, antioxidantes, antiespumantes, conservantes, emulsificantes, estabilizantes, reguladores de acidez, realçadores de sabor, antieméticos, antiaglutinantes, corantes, e solventes de extração e processamento (BRASIL, 2007; NUNES et al., 2016). Mundialmente, esses aditivos são autorizados para uso pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) (XU et al., 2011; MARQUES et al., 2015), e no Brasil pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) por meio da Resolução RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007 (BRASIL, 2007; SALES et al., 2017).

Apesar de conferirem propriedades organolépticas essenciais aos alimentos industrializados, muitos aromatizantes ainda não têm estabelecidos seus Índices de Ingestão Diária Aceitáveis (IDA), uma vez que estudos de avaliações toxigenéticas sobre os mesmos são escassos na literatura científica (XU et al., 2011; KONISHI et al., 2011; KOCA et al., 2015, MOURA et al., 2016). Dessa forma, verifica-se relevância na realização de estudos de avaliação de toxicidade e a determinação do potencial tóxico, citotóxico, genotóxico, mutagênico e carcinogênico de aditivos de aroma e sabor (XU et al., 2011; KOCA et al., 2015; MARQUES et al., 2015; SALES et al., 2017). Ademais, enfatiza-se a necessidade dessas avaliações salientando que os tipos mais comuns de câncer resultam da interação entre fatores endógenos e ambientais, e o mais notável desses agentes é a dieta alimentar, particularmente quando constituída de alimentos industrializados em demasia (XU et al., 2011; KOCA et al., 2015; SALES et al., 2018).

Os meristemas de raízes de *Allium cepa* L. são considerados no meio científico um eficiente teste para o *scrennig* preliminar da citotoxicidade e genotoxicidade de

compostos químicos (HERRERO et al., 2012; CAMPUS-VENTURA; MARIN-MORALES, 2016; MARTINS; PERON, 2017). A eficiência se dá principalmente em razão da espécie *A. cepa* apresentar número cromossômico reduzido ($2n=16$), o que permite a detecção de distúrbios no índice de proliferação celular, e de alterações celulares (NEVES et al., 2014; LEAL et al., 2017). Outro organismo teste relevante para a avaliação inicial da toxicidade é a *Artemia salina* (Anostraca) (ROSA et al., 2016). Náuplios dessa espécie são utilizados como ensaio biológico para avaliar a toxicidade de diferentes compostos naturais e/ou sintéticos (PAREDES et al., 2016; SILVA et al., 2017).

Portanto, objetivou-se no presente estudo avaliar, por meio de diferentes tratamentos, a toxicidade em náuplios de *A. salina*, e a citotoxicidade e a genotoxicidade em células meristemáticas de raízes de *A. cepa*, dos aromatizantes, sintéticos idênticos aos naturais, de hortelã, canela e limão. Esses aditivos foram escolhidos por serem amplamente encontrados em alimentos doces industrializados.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Aditivos alimentares

Aditivo alimentar é todo e qualquer ingrediente adicionado aos alimentos intencionalmente, sem o propósito de nutrir, mas com o objetivo de modificar as características físicas, químicas, biológicas ou sensoriais do alimento (ALBUQUERQUE et al., 2012).

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

Esses microingredientes se tornaram obrigatórios na alimentação moderna, sobretudo por sua capacidade de manter a qualidade e a validade dos alimentos vendidos em supermercados assegurando modificações nos alimentos, tornando-os mais agradáveis ao consumo (GOVEIA, 2006).

Segundo More et al. (2012) os aditivos alimentares desempenham diversas funções conforme expresso no quadro abaixo:

Classe de aditivo	Função
Corantes	Coloração dos produtos
Aromatizantes (ou flavorizantes)	Alteração do aroma/sabor
Edulcorantes	Adoçar produtos mesmo em pequena quantidade
Conservantes	Ajudar os produtos a ter maior durabilidade
Antioxidantes	Evitar que óleos e gorduras dos alimentos combinem com oxigênio tornando-se rançosos
Antiumectantes	Evitar que os produtos secos se humedecem
Espessantes	Aumentar a viscosidade de alimentos, geralmente na forma líquida

Estabilizantes	Promover uma integração homogénea de ingredientes como óleo e água, por exemplo, que normalmente se separariam
Umectantes	Manter húmidos os alimentos evitando o seu ressecamento;
Acidulantes	Aproximar o sabor dos produtos da acidez da fruta que dá nome ao produto
Antiespumíferos	Evitar a formação de espumas em alimentos líquidos, durante seu processo de fabricação, ou produto final

Quadro 1 – Classes de Aditivos Alimentares (Adaptado de VALSECHI, 2001). **Fonte:** Valsechi, 2001.

Os aditivos alimentares, embora sejam muitas vezes imprescindíveis na indústria alimentícia, são responsáveis por danos à saúde, principalmente quando ingeridos diariamente em grandes quantidades ou quando apresentam quantidades superiores ao recomendado pelas autoridades ligadas à alimentação e a saúde (BRASIL, 2007). Convém destacar que 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; BERTGES; ASSIS, 2007; KONISHI et al., 2011).

2.2 Aromatizantes alimentares

Os aromatizantes alimentares são substâncias que conferem ou intensificam o aroma e o sabor dos alimentos, podendo ser subdivididos em essência natural, essência sintética, produto aromático, sávido, volátil, oleoso e extraído de vegetais (LIMA, 2011).

Classificados na indústria como naturais, sintéticos idênticos aos naturais e sintéticos artificiais, caracterizam-se também por possuírem formulação complexa, constituída por uma variedade de compostos químicos (BRASIL, 2007). Na visão de Honorato e Nascimento (2013) estes compostos são geralmente agrupados como *saborizantes* ("flavorizantes"), que são agentes capazes de conferir ou ressaltar o sabor, compreendendo vários e grandes grupos. São amplamente encontrados em alimentos principalmente doces industrializados, como balas, gomas, sorvetes, mousses, cookies e bolos. E apresentam grande importância para a indústria alimentícia justamente por sua capacidade aromatizante, baixo custo e tempo de permanência nos alimentos (SALINAS, 2002).

A formulação química complexa dos aromatizantes são consideradas um avanço polêmico por alguns pesquisadores, como Carvalho et al. (2009), Pflanzler et al. (2010), Zaineddin et al. (2010), More et al. (2012) e Honorato et al. (2013), que argumentam que esses microingredientes contribuem de forma significativa para o empobrecimento da dieta e no desencadeamento de patologias, principalmente em crianças. Ainda, pesquisadores como Pflanzler et al. (2010) e Zaineddin et al. (2010), alertam que a utilização de aromatizantes, com ênfases aos artificiais, suscita uma série de dúvidas quanto a sua citotoxicidade e genotoxicidade.

Estudos recentes demonstraram que os aromatizantes alimentares podem ser tóxicos quando utilizados por tempo prolongado, promovendo hiperatividade em crianças com e sem déficit de atenção (MORE et al., 2012), diminuição significativa na concentração de hemoglobina no sangue, alterações drástica no funcionamento do fígado e diminuição significativa no peso de camundongos, bem como, alergias, hipersensibilidade cutânea e indigestão em humanos (ZEUIM et al., 2011).

2.3 Regulamentações sobre aditivos alimentares

Em âmbito mundial, para a utilização de aditivos alimentares de forma controlada tem-se por base a Ingestão Diária Aceitável (IDA) expressa em miligrama por quilo de peso corpóreo, que pode ser ingerida diariamente, durante toda a vida, sem oferecer risco apreciável à saúde, ou seja, é a quantidade suficiente para obter o efeito tecnológico desejado, desde que não alterem a identidade e a genuinidade do alimento (BRASIL, 2010).

No Brasil a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é o órgão responsável por regulamentar o uso dos aditivos alimentares, esse órgão ressalta que apesar da grande vantagem de utilização de aditivos em alimentos, existe a preocupação constante quanto aos potenciais riscos toxicológicos decorrentes da ingestão diária dessas substâncias químicas (BRASIL, 2007). Uma vez que, esse órgão ressalta também que há a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, tendo em vista a proteção da saúde da população, além da necessidade de segurança de uso de aditivos alimentares na fabricação de alimentos, já que são amplamente utilizados. Somando-se a isso, o uso dessas substâncias devem ser

limitado principalmente aos alimentos utilizados de forma constante, sendo também necessário mais informações desses aditivos aos consumidores. (BRASIL, 2007).

A FEMA (*Flavour and Extract Manufactuer Association*) também mencionam em seus arquivos a necessidade constante de estudos toxicológicos de efeito agudo envolvendo os aditivos alimentares em geral, e de ser comumente necessário o aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos pretendendo-se sempre o bem estar de quem os utiliza, e também por serem a base de elaboração ou modificação de estratégias de órgãos regulamentadores e de profissionais responsáveis pela vigilância alimentar e nutricional da população. (KONISHI et al., 2011)

2.4 Sistema teste utilizando *Allium cepa*

O teste de *Allium cepa* (cebola) é bastante útil para a pesquisa básica do potencial genotóxico e citotóxico de produtos químicos. Além disso, é um teste viável pela elevada sensibilidade, baixo custo, rapidez, facilidade de manipulação e da utilização de amostras sem tratamento prévio, determinando-se a diminuição do índice mitótico e da formação de aberrações cromossômicas. As vantagens com o teste *Allium cepa* ocorrem por conta de diversos fatores como: ser um teste sensível; apresentar alto percentual de células em divisão; cromossomos uniformizados; boas correlações com outros sistemas e testes com mamíferos e humanos; indicador de toxicidade; investigações para poluentes ambientais; toxicidade de compostos químicos; avaliação de propriedades anticâncer; avaliação de extratos vegetais para toxicidade, citotoxicidade e mutagenicidade. (HERRERO et al., 2012).

Uso das raízes meristemáticas de *A. cepa* (cebola), permite a prévia observação de possíveis danos e alterações no material genético, bem como a identificação de efeitos tóxicos desencadeados ao longo do ciclo celular. Dessa forma, a utilização dos meristemas de *A. cepa* trata-se de um método de análise da toxicidade em nível celular e pode ser usado como indicativo para prevenir a população sobre o consumo de produtos e/ou substâncias químicas (TABREZ et al., 2011; CARDOSO et al., 2014).

Esse modelo biológico é utilizado, para investigar a genotoxicidade em conservantes e aditivos alimentares, pois propõe a demonstração de que essas substâncias sintéticas atuam no ciclo celular alterando assim o tempo de proliferação das células. Além disso, é muito importante demonstrar o efeito dos aromatizantes alimentares encontrados em alimentos que fazem parte do cotidiano da população,

representando uma forma de alertá-los sobre os riscos de muitas substâncias às quais todos estão expostos (HERRERO et al., 2012).

Kurás (2006), também relata que esse sistema teste é de fácil preparação para análise, porque contém células meristemáticas em constante divisão, tem cromossomos grandes e em número baixo (16 cromossomos), além de ser facilmente corados e observados. Além disso, Takahashi et al. (2004) diz ainda que conhecer os componentes físicos, químicos e biológicos que causam alterações gênicas, é necessário para melhor preservar a saúde humana.

2.5 Sistema teste utilizando *Artemia salina*

Artemia salina é uma espécie de microcrustáceo da ordem Anostraca, encontrado em águas marinhas (CARVALHO et al., 2009). Ela é utilizada em testes de toxicidade, devido à sua capacidade para formar cistos, praticidade de manuseio, cultivo e por ser um método rápido e barato, sendo também aplicável como bioindicador em avaliações toxicológicas. (FREITAS DE OLIVEIRA et al., 2008; CARVALHO, C. A. de. et al., 2009). Essa espécie tem sido utilizada em experimentos laboratoriais como um bioindicador de toxicidade de substâncias químicas, sendo indicado como um eficiente teste, pois a letalidade desse organismo tem sido utilizada para identificação de repostas biológicas, nas quais as variáveis como a morte ou vida são as únicas envolvidas (MEYER et al., 1982).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção dos aromatizantes

Os aditivos de aroma e sabor dos tipos sintéticos idênticos aos naturais, comercializados na forma líquida não oleosa, de hortelã, canela e limão, foram obtidos de uma indústria de fabricação de aditivos alimentares localizada na cidade São Paulo, Estado de São Paulo, Brasil, especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares.

3.2 Determinação dos tratamentos ou concentrações.

Nos rótulos dos produtos, sugeria-se utilizar os aromatizantes das seguintes maneiras: puro, conforme a exigência do alimento ou por conveniência. Portanto, para a avaliação em meristemas de raízes *Allium cepa* cada aromatizante foi avaliado: puro (exatamente como é comercializado) e nas proporções 1:1, 1:2 e 1:4 v:v (solução aromatizante: água destilada). Para as avaliações frente as larvas de *Artemia salina*, analisou-se os microingredientes a partir dos seguintes concentrações: 1000; 500; 250; 125; 62,5; 31,25; 15,62; 7,81 e 3,90 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

3.3 Avaliação da toxicidade em náuplios de *A. salina*

O teste de toxicidade frente à *Artemia salina* foi realizado segundo os protocolos propostos por Meyer et al. (1982) e Paredes et al. (2016). Cistos de *A. salina* foram incubados por 24 h em solução de sal marinho sintético (30 g. L⁻¹) dentro de um recipiente de vidro equipado com um compartimento escuro e outro com a recepção de luz artificial. A água foi mantida à temperatura ambiente, sob agitação e aeração constante, por um período de 48 horas até eclosão das larvas. Diferentes concentrações dos aromatizantes (1000 - 3,6 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) foram previamente preparadas em água salgada. Com o auxílio de uma pipeta Pasteur as larvas de microcústáceos (n=10) foram transferidas para tubos de ensaio contendo 3 mL das soluções. O controle foi feito apenas com água salgada. Todos os teste foram realizados em triplicata e o número de larvas mortas foram contadas após 24 horas.

3.4 Avaliação da citotoxicidade e genotoxicidade em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L.

Para a realização do bioensaio com *A. cepa*, bulbos de cebola foram postos em frascos com água destilada, à temperatura ambiente ($\pm 27^{\circ}\text{C}$) que foram aerados constantemente, até a obtenção de raízes de 2,0 cm de comprimento. Para a análise de cada tratamento utilizou-se cinco bulbos de cebola. Antes de colocar os bulbos em contato com os seus respectivos tratamentos, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram postas em suas respectivas soluções por 24 horas, procedimento denominado de tempo de exposição 24 horas. Após este tempo foram retiradas algumas raízes e fixadas.

Feito tal procedimento, as raízes restantes de cada cebola foram devolvidas aos seus respectivos tratamentos onde permaneceram por mais 24 horas, o que se denominou de tempo de exposição 48 horas. Após esse período, raízes novamente foram coletadas e fixadas. A fixação das raízes se deu em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético) por 24 horas. Em cada coleta, retirou-se, em média, três raízes por bulbo. Portanto, todo tratamento foi constituído de três grupos de análise, o Controle, o Tempo de Exposição 24 horas e o Tempo de Exposição 48 horas, e para cada grupo analisou-se um total de 5.000 células, ou seja, mil células por bulbo. O procedimento descrito para a coleta de dados por meio do sistema teste *A. cepa* utilizou como parâmetro os trabalhos de Gomes et al. (2013), Oliveira et al. (2013), Sales et al. (2016), Campos-Ventura e Marin-Morales (2016) e Martins e Peron (2017).

3.5 Preparo e leitura das lâminas

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra e Souza (2002). Cada lâmina foi corada com duas gotas deorceína acética a 2% e analisada em microscópio óptico, em objetiva de 40x. Para cada bulbo foi analisadas 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada controle e concentração. Durante a análise foram observadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Foi calculado o número de células em interfase e em divisão de cada controle e tempos de exposições e determinado o índice mitótico. Também foi avaliada a presença de aberrações celulares como anomalias do ciclo mitótico (metáfases colchícinicas,

pontes anafásicas e pontes telofásicas) e anomalias interfásicas (células micronucleadas e células binucleadas). Para esta avaliação foi analisada 1.000 células de cada controle e tempo de exposição.

3.6 Análise estatística

A análise estatística dos dados referente ao ensaio de *A. cepa* foi realizada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), com nível de probabilidade <0.05 , por meio do software estatístico BioEstat 3.0 (Ayres et al., 2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Com base nos resultados apresentados na Tabela 01, verifica-se que os índices mitóticos obtidos para as células meristemáticas de raízes de *A. cepa* expostas aos aromatizantes de canela, limão e hortelã, na forma pura e nas três proporções analisadas, em 24 e 48h de exposição, foram significativamente menores que os índices de divisão celular observados para os seus respectivos tempos de exposição 0h. Os índices de divisão celular observados para os tempos de análises 24 e 48 h de todos os tratamentos também demonstraram inibição significativa da divisão celular ao tecido meristemático quando confrontado aos valores de índices mitóticos obtidos para o controle negativo (água destilada) relacionados aos mesmos tempos de exposição. Não foram observadas alterações celulares em número significativo nas células meristemáticas expostas aos tratamentos com os aromatizantes avaliados. Dessa forma, nas condições de análises estabelecidas para este bioensaio, os microingredientes em estudo foram citotóxicos, porém, não genotóxicos.

Tabela 1. Índices mitóticos observados em tecidos meristemáticos de raízes de *Allium cepa* expostos, nos tempos de exposição 0, 24 e 48 horas, aos aromatizantes alimentares de canela, limão e hortelã, avaliados por meio dos seguintes tratamentos: puro e diluídos em água destilada nas proporções 1:1(50%); 1:2(25%); 1:3(1,5%) (v:v). Em cada tratamento foram apresentados os valores significativos de índices mitóticos.

		TE/IM (%)		
		0 h	24 h	48 h
Controle negativo		41,9 ^a	41,7 ^a	41,3 ^a
Aromatizantes				
	TR	0 h	24 h	48 h
Hortelã	Puro	42,1 ^a	7,1 ^{b*}	4,8 ^{b*}
	50%	40,9 ^a	12,1 ^{b*}	10,3 ^{b*}
	25%	39,9 ^a	14,1 ^{b*}	10,1 ^{b*}
	12,5%	40,1 ^a	16,9 ^{b*}	15,3 ^{b*}
Canela	Puro	39,9 ^a	5,1 ^{b*}	2,9 ^{b*}
	50%	41,3 ^a	10,9 ^{b*}	8,9 ^{b*}
	25%	37,9 ^a	10,6 ^{b*}	9,4 ^{b*}
	12,5%	40,0 ^a	13,1 ^{b*}	9,2 ^{b*}
Limão	Puro	39,9 ^a	3,1 ^{b*}	1,7 ^{b*}
	50%	39,0 ^a	9,4 ^{b*}	7,2 ^{b*}
	25%	41,1 ^a	14,1 ^{b*}	12,9 ^{b*}
	12,5%	40,1 ^a	13,8 ^{b*}	11,4 ^{b*}

TE: tempo de exposição; IM: índice mitótico; h: hora; TR: tratamento.

Conforme citado por Herrero et al. (2012), índices mitóticos significativamente inferiores aos índices dos controles - como os observados no presente estudo para os aromatizantes de canela, limão e hortelã - indicam a presença de agentes cuja ação tóxica compromete o crescimento e o desenvolvimento dos organismos expostos. Ademais, esses autores declaram que a inibição da proliferação celular desencadeada por compostos citotóxicos em tecidos de intensa proliferação celular e com desempenho normal, como os utilizados nesta pesquisa, é bastante prejudicial ao organismo por inibir ou limitar a reposição de células, alterar a produção de proteínas e resultar no mal funcionamento do órgão onde está localizada. Tais prejuízos, segundo Valavanidis et al. (2013) e Zilifdar et al. (2014), podem comprometer significativamente a divisão celular do tecido ou órgão afetados e desencadear e/ou potencializar processos cancerosos.

Sobre a condição dos aromatizantes terem apresentado em *A. cepa* potencial citotóxico, mas não genotóxico, Sales et al. (2016) ressaltam que a inibição drástica da divisão em tecidos normais podem ocorrer pela ação de agentes que afetam a integridade do fuso nuclear durante a mitose promovendo significativo desarranjo cromossômico. Ao considerar que o princípio do ciclo celular é a formação de células idênticas, a produção de novas células com alteração significativa na estrutura e/ou no número cromossômico tornam o funcionamento celular inviável e tendem a ser eliminadas de tecidos com desempenho normal, o que pode acarretar efeito antiproliferativo significativo.

Em relação aos resultados de toxicidade obtidos em *A. salina*, as nove concentrações analisadas para os aromatizantes de canela, limão e limão causaram 100% de letalidade dos náuplios expostos. Assim, os resultados observados em *A. salina* corroboram aos dados de citotoxicidade obtidos em *A. cepa*.

De acordo com Honorato et al. (2013) os aromatizantes em geral, são considerados a classe de aditivos alimentares menos estudada do ponto de vista toxicológico, partindo do princípio que são amplamente utilizados pela população. Porém, citam que a exposição á longo prazo a estes aditivos sintéticos desencadeiam hiperatividade em crianças, diminuição significativa na concentração de hemoglobina, alterações drásticas no funcionamento do fígado, perda de peso, alergias, hipersensibilidade cutânea e má digestão em adultos. No entanto, ressaltam que tais resultados, até o momento, são considerados inconclusivos por muitos pesquisadores.

Diferentemente, Salinas (2002) mostra que a utilização de aromatizantes alimentares de modo geral, em baixas concentrações, não promove risco a saúde humana. Entretanto, quando as doses são elevadas, este autor relata que estes aditivos causam ações irritantes e narcóticas ao ser humano. Em consonância, com o Regulamento Técnico sobre Aromatizantes/Aroma e Sabor, aprovado pela ANVISA em 2007, e ainda em vigência, a formulação de qualquer aromatizante alimentar sintético é padronizada, sendo de responsabilidade das agências de segurança alimentar a fiscalização de sua composição (BRASIL, 2007). Porém, não foi encontrado nos documentos técnicos das agência reguladoras, nos rótulos, nos sites de fabricantes e na literatura científica a composição específica dos aromatizantes de canela, limão e hortelã.

No entanto, há trabalhos que evidenciam toxicidade em nível celular de constituintes químicos com ações diluente e conservante presentes, segundo a Resolução RDC nº 2 de 15 de janeiro de 2007, na formulação básica dos aditivos de aroma e sabor, e que validam os dados obtidos para os três aromatizantes avaliados no presente estudo. Entre estes compostos está o álcool benzoico, responsável por manter a uniformidade e facilitar a incorporação e dispersão dos aromas nos produtos alimentícios. Em análise a ação em nível celular deste diluente, Demir et al. (2010) verificaram que este álcool promoveu danos significativos ao fuso mitótico, e, conseqüentemente, a divisão celular de células de sangue periférico humano.

Outro diluente encontrado na formulação dos aromatizantes é o diacetil (2,3-butadiona). Whittaker et al. (2008) citam que este composto em ensaio de mutação gênica em linfoma de ratos causou danos significativos ao loci do cromossomo 11 destas células, causando perda de expressão dos genes para enzima timidina-quinase. Ainda, More et al. (2012) verificaram que o diluente diacetil teve o potencial de substituir bases de timina por guaninas em regiões de eucromatina e ocasionar o rompimento de pontes de hidrogênio e de dissulfeto em estrutura terciária de enzimas envolvidas no processo de divisão celular. Na composição dos aromatizantes alimentares também são encontrados os compostos conservantes ácido bórico, ácido cítrico, citrato de potássio e citrato de sódio (BRASIL, 1999) que, de acordo Tükoğlu (2007), acarretaram redução significativa ao índice de divisão celular de células de meristemas de raízes de *A. cepa*, mostrando-se citotóxicos.

Portanto, verifica-se que embora a utilização dos aromatizantes alimentares seja permitida pela FAO e ANVISA há urgente necessidade de esclarecimentos, por meio de

estudos mais detalhados, a médio e longo prazo, em diferentes sistemas teste, dosagens e tempo de exposição, quanto a toxicidade destas substâncias. Ademais, os resultados obtidos nesta pesquisa, mesmo que preliminares, aliados aos resultados de avaliação da toxicidade em nível celular de compostos presentes na formulação dos aromatizantes alimentares anteriormente realizados, indicam a necessidade em definir, como por cromatografia de alta performance, a composição química dos aromatizantes de canela, limão e hortelã, para assim se determinar com propriedade a toxicidade destes aditivos e garantir a segurança daqueles que os consomem.

5 CONCLUSÃO

A partir dos resultados obtidos verificou-se que os aromatizantes de canela, limão e hortelã foram amplamente citotóxicos aos meristemas de raízes de *A. cepa* e as larvas de *A. salina*, demonstrando que esses produtos apresentam uma toxicidade que deve ser mais estudada pelos órgãos competentes.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBUQUERQUE, M. V. et al. Educação Alimentar: Uma Proposta de Redução do Consumo de Aditivos Alimentares. **Química Nova na Escola**, v. 34, p. 1-7, 2012.

BAGATINI, M. D.; SILVA, A. C. F.; TEDESCO, S. B. Uso do sistema teste de Allium cepa como bioindicador de genotoxicidade de infusões de plantas medicinais. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v. 17, p. 444-447, 2007.

BAROSA, J. et al. **Teste de toxicidade de cobre para Artemia salina** – Poluição e ecotoxicologia marinha, 2003.

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

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

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução – RDC n. 104, de 14 de maio de 1999**. Aprova o Regulamento Técnico sobre aspectos gerais de Aditivos Aromatizantes/Aroma. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RDC_02_2007_COMP.pdf/c966caff-1c19-4a2f-87a6-05f7a09e940b>. Acesso em: 16 jun, 2018.

BRASIL, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 45, de 03 de novembro de 2010**. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2010/rdc/028170107rdc.pdf>>. Acesso em: 19 jun, 2018.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Resolução da Diretoria Colegiada RDC nº.05, de 15 de Janeiro de 2007**. Disponível em<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2007/rdc/02_170107rdc.pdf>. Acesso em: 30 de abr. 2018.

CARDOSO, G. H. S. et al. Cytotoxicity of aqueous extracts of *Rosmarinus officinalis* L. (Labiatae) in plant test system. **Brazilian Journal Biology**. v. 74, p. 886-889, 2014.

CARVALHO, P. R.; Aditivos dos Alimentos. **Revista Logos**, São Paulo, pp. 57-69, 2005.

CARVALHO, C. A. et al. Cipó-cravo (*Tynnanthus fasciculatus* miers- Bignoniaceae): Estudo fitoquímico e toxicológico envolvendo *Artemis salina*. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 6, p. 51-58, 2009.

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

CUCHIARA, C. C.; BORGES, C. S.; BOBROWSKI, V. L. Sistema teste de *Allium cepa* como bioindicador da citogenotoxicidade de cursos d'água. **Revista Tecnologia & Ciência Agropecuária**, João Pessoa, v. 6, p. 33-38, 2012.

DEMIR, E.; KOCAOGLU, S.; KAYA, R. Assessment genotoxic effects of benzyl derivatives by comet assay. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 1239-1242, 2010.

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

GANESSAN, L. et al. The food colorant erythrosine is a promiscuous protein-protein interaction inhibitor. **Biochemical Pharmacology**, v. 81, p. 810-18, 2011.

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

GUERRA, M.; SOUZA, M. J. **Como observar os cromossomos: um guia de técnicas em citogenética vegetal, animal e humana**. Ribeirão Preto: FUNPEC, p. 340, 2002.

HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v. 743, p. 20-24, 2012.

HONORATO, T. C. et al. Aditivos alimentares: aplicações e toxicologia. **Revista Verde**, v. 8, p. 01-11, 2013.

KOCA, N.; ERBAY, Z.; KAYMAK-ERTEKIN, F. Effects of spray-drying conditions on the chemical, physical, and sensory properties of cheese powder. **Journal Dairy Sciences**, v. 98, p. 2934-2943, 2015.

KONISHI, Y.; HAYASHI, S. M.; FUKUSHIMA, S. Regulatory forum opinion piece*: supporting the need for international harmonization of safety assessments for food flavoring substance. **Toxicologic Pathology**, v. 42, p. 949-953, 2011.

KURAS, M. et al. Changes in chromosome structure, mitotic activity and nuclear DNA content from cells of *Allium test* induced by bark water extract of *Uncariatomentosa* (Willd.) DC. **Journal Ethnopharmacol**, v. 107, p. 211–221, 2006.

LEME, D. M.; MARIN-MORALES, M. A. *Allium cepa* test in environmental monitoring: A review on its application. **Mutation Research**, v. 682, p. 71–81, 2009.

LERNER, C. A. et al. Vapors produced by electronic cigarettes and e-juices with flavorings induce toxicity, oxidative stress, and inflammatory response in lung epithelial cells and in mouse lung. **PloS one**, v. 10, p. e0116732, 2015.

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

MARINI, B. L. V.; FUMAGALLI, F. O aumento no consumo de aditivos alimentares: malefícios do corante caramelo IV para o consumo humano e sua alta concentração em

bebidas com cola no Brasil. **Revista Conexão Eletrônica**, Três Lagoas, v. 13, p. 1-9, 2016.

MARQUES, G. S. et al. Cytotoxicity and mutagenic potential of liquid synthetic food flavoring evaluated individually and in association. **Food Sciences Technology**, v. 35, p. 183-88, 2015.

MARQUES, G.S. et al. Cytotoxicity and mutagenic potential of liquid synthetic food flavoring evaluated individually and in association. **Food Science and Technology**, v. 35, p. 183-188, 2015.

MEYER, B.N. et al. A convenient general bioassay for active plant constituents. **Planta Medica**, v.45, p.31-34, 1982.

MORE, S. S.; RAZA, A.; VINCE, R. The butter flavorant, diacetyl, forms a covalent adduct with 2-deoxyguanosine, uncoils DNA, and leads to cell death. **J. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 60, p. 3311-17, 2012.

MOURA, A. G. et al. Cytotoxicity of Cheese and Cheddar Cheese food flavorings on *Allimcepa*L. root meristems. **Brazilian Journal of Biology**, v. 76, p. 439-443, 2016.

MPOUNTOUKAS, P. et al. Cytogenetic evaluation and DNA interaction studies of the food colorants amaranth, erythrosine and tartrazine. **Food and Chemical Toxicology**, v. 48, p. 2934-2944, 2010.

NEVES, E. S. et al. Action of Aqueous Extracts of *Phyllanthus niruri* L. (Euphorbiaceae) leaves on Meristematic Root Cells of *Allium cepa* L. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 86, p. 1131- 1136, 2014.

PAREDES, P. F. M. et al. Screening of bioactivities and toxicity of *Cnidocolus quercifolius* Pohl. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 1, p. 1-9, 2016.

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

ROSA, C. S. et al. Composição química e toxicidade frente *Aedes aegypti* L. e *Artemia salina* Leach do óleo essencial das folhas de *Myrcia sylvatica* (G. Mey.) DC. **Revista Brasileira de Plantas Mediciniais**, v. 18, p. 19-26, 2016.

SALES, I. M. S. et al. Acute Toxicity of Grape, Plum and Orange Synthetic Food Flavours Evaluated *in vivo* Test Systems. **Food Technology and Biotechnology**, Zagreb, v. 55, p. 131-137, 2017.

SALINAS, R.D. **Alimentos e Nutrição: Introdução a Bromatologia**. Porto Alegre: Artmed, p. 300, 2002.

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

SILVA, E. L. et al. Processed fruit juice ready to drink: screening acute toxicity at the cellular level. *Acta Scientiarum. Biological Sciences*, v. 39, p. 195-200, 2017.

TABREZ, S. et al. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an overview of the techniques and their efficacies. *Journal of Environmental Science and Health*; v. 29, p. 250-275, 2011.

TAKAHASHI, H. et al. Toxicity studies of partially hydrolyzed guar gum. *Journal of the American College of Toxicology*, v. 13, p. 273-278, 1994.

TONETTO, A. et al. **O uso de aditivos de cor e sabor em produtos alimentícios**. São Paulo: Faculdade de ciências farmacêuticas, 2008.

TÜRKOĞLU, Ş. Genotoxicity of five food preservatives tested on root tips of *Allium cepa* L. *Mutation Research*, v. 626, p. 4-14, 2007.

WHITTAKER, P. et al. Evaluation of the butter flavoring chemical diacetyl and a fluorochemical paper additive for mutagenicity and toxicity using the mammalian cell gene mutation assay in L5178Y mouse lymphoma cells. *Food Chemical and Toxicology*, v. 46, p. 2928-2933, 2008.

XU, Z. et al. Arctigenic acid, the key substance responsible for the hypoglycemic activity of *FructusArctii*. *Phytomedicine*, v. 22, p. 128-137, 2015.

ZAINEDDIN, A. K. et al. The association between dietary lignans, phytoestrogen-rich foods, and fiber intake and postmenopausal breast cancer risk: a German case-control study. *Nutrition and Cancer*, v. 64, p. 652-665, 2012.

ZEQUIN, N. et al. The evaluation of the genotoxicity of two food preservatives: sodium benzoate and potassium benzoate. *Food and Chemical Toxicology*, v. 49, p. 763-69, 2011. DOI: 10.1016/j.fct.2010.11.040.

ZILIFDAR, F. et al. Genotoxic potentials and eukaryotic DNA topoisomerase I inhibitory effects of some benzoxazine derivatives. *Medicinal Chemistry Research*, v. 23, p. 480-486, 2014.



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

Identificação do Tipo de Documento

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

Eu, Fabelina Karollyne Silva 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
Toxicidade e Genotoxicidade de Aromatizantes Ali-
mentares de Hortelã, Canela e Limão
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 23 de abril de 2019.

Fabelina Karollyne Silva dos Santos
Assinatura

Fabelina Karollyne Silva dos Santos
Assinatura