



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

FRANCISCO RONIELSON DE SOUSA CARVALHO

**CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE AROMATIZANTES
ALIMENTARES SINTÉTICOS SALGADOS, IDÊNTICOS AOS NATURAIS, EM
MERISTEMAS DE RAÍZES DE *Allium cepa* L.**

PICOS, PIAUÍ

2014

FRANCISCO RONIELSON DE SOUSA CARVALHO

**CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE AROMATIZANTES
ALIMENTARES SINTÉTICOS SALGADOS, IDÊNTICOS AOS NATURAIS, EM
MERISTEMAS DE RAÍZES DE *Allium cepa* L.**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Peron.

PICOS, PIAUÍ

2014

Eu, **Francisco Ronielson de Sousa Carvalho**, abaixo identificado(a) como autor(a), autorizo a biblioteca da Universidade Federal do Piauí a divulgar, gratuitamente, sem ressarcimento de direitos autorais, o texto integral da publicação abaixo discriminada, de minha autoria, em seu site, em formato PDF, para fins de leitura e/ou impressão, a partir da data de hoje.

Picos-PI, 01 de julho de 2014.

Francisco Ronielson de Sousa Carvalho
Assinatura

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

C331c Carvalho, Francisco Ronielson de Sousa.
Citotoxicidade e mutagenicidade de aromatizantes alimentares sintéticos salgados idênticos aos naturais em meristemas de raízes de *Allium* / Francisco Ronielson de Sousa Carvalho. – 2013.
CD-ROM il; 4 ¾ pol. (28 p.)

Monografia(Licenciatura em Ciências Biológicas) –
Universidade Federal do Piauí. Picos-PI, 2013.
Orientador(A): Profa. Dra. Ana Paula Peron

1. Aberrações Celulares. 2. Aditivos Alimentares. 3.
Divisão Celular. 4. Sistemas – Teste Vegetal. I. Título.

CDD 581.4

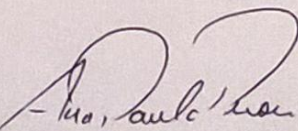
FRANCISCO RONIELSON DE SOUSA CARVALHO

**CITOTOXICIDADE E MUTAGENICIDADE DE AROMATIZANTES
ALIMENTARES SINTÉTICOS SALGADOS, IDÊNTICOS AOS NATURAIS, EM
MERISTEMAS DE RAÍZES DE *Allium cepa* L.**

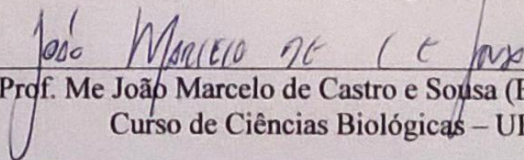
Monografia apresentada ao curso de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Piauí,
Campus Senador Helvídio Nunes de Barros, como requisito parcial para a obtenção do grau
de Licenciado em Ciências Biológicas.

Monografia aprovada em 30 / 03 / 14

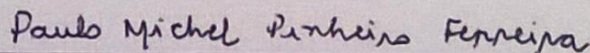
BANCA EXAMINADORA



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



Prof. Me João Marcelo de Castro e Sousa (Examinador)
Curso de Ciências Biológicas – UFPI



Prof. Dr. Paulo Michel Pinheiro Ferreira (Examinador)
Curso de Ciências Biológicas – UFPI

A minha família, e em especial a minha querida avó Laurita Ana de Sousa que sempre me incentivou a colocar os estudos acima de tudo.

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À minha família, por todo sacrifício de nunca me deixar faltar nada, em especial aos meus pais, Manoel Pereira de Carvalho e Maria do Rosário de Sousa Carvalho pela dedicação em me educar, abdicando muitas vezes de seus sonhos em favor dos meus, para que eu pudesse estar aqui hoje sendo o homem responsável que sou. As minhas irmãs Ana Rosiele de Sousa Carvalho e Liliana de Sousa Carvalho por sempre me alegrarem e me darem forças, me mostrando que ser alguém na vida pode ser possível.

À Prof.^a Dr.^a Ana Paula Peron, pela orientação, colaboração, paciência e atenção para que eu pudesse desenvolver este trabalho. Você foi realmente, acima de tudo, minha mãe durante esse curso, que me protegeu e me fez crescer dentro do mundo acadêmico me mostrando que eu sou capaz de tudo se eu quiser. Agradeço ainda por ter acreditado mim em meio a tantas pessoas e ter me escolhido como seu filho para aprender tudo ao máximo do que você sabe. Resumindo, você é um exemplo de pessoa, que sempre me tratou com educação e respeito! Espero que nossa relação de amizade seja bem longa e se possível ETERNA...

Aos amigos da universidade, Adriano, Darciella, Gabriel, Jodson, Leonides, Louridânia e Maria Laurentina que sempre estiveram comigo nas horas de alegria e tristeza, me mostrando que uma amizade verdadeira pode existir.

Aos meus amigos, Wallison e Jakelline que sempre me distraíam quando eu estava com a cabeça quente por conta dos estudos, pelos momentos de alegria que me fizeram esquecer os problemas da vida. Em especial a Ykaro Richard que apesar do pouco tempo de convívio foi como um irmão pra mim que conversava, me dava conselhos e estava comigo me fazendo rir mesmo quando eu já estava chorando. Nunca terminarei de pagar a você pelas alegrias que proporcionou a minha vida.

Aos meus companheiros de laboratório, Jucimaura, Ellifran e Paula muito obrigada por toda a ajuda. Em especial a Gleuvânia que foi meu braço direito me ajudando mesmo sem poder para que eu concluísse este trabalho.

Aos mestres pelos ensinamentos repassados, as dúvidas esclarecidas, pela amizade e paciência.

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

OBRIGADO!!!

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

A vida ensina e o tempo traz o tom, pra nascer uma canção. Com a fé do dia a dia encontro a solução, encontro a solução...”

(Da Gama / Toni Garrido)

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade de aromatizantes alimentares sintéticos, idênticos aos naturais, de sabores Manteiga e Queijo Cheddar, nas doses de: 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL, e nos tempos de exposição (TE) de 24 e 48 horas. Para avaliação de cada dose utilizou-se um grupo de cinco bulbos de cebolas, que primeiro foram enraizados em água destilada, e em seguida transferidos para as suas respectivas soluções. As radículas foram coletadas e fixadas em ácido acético (3:1) por 24 horas. As lâminas foram preparadas pela técnica de esmagamento e coradas com orceína acética a 2%. Analisaram-se células em todo ciclo celular, totalizando 5.000 para cada controle e tempo de exposição. Os índices mitóticos calculados e as aberrações celulares observadas foram submetidos à análise estatística do Qui-quadrado ($p < 0,05$). A partir dos resultados observou-se que para o aromatizante de Manteiga nas doses de 1,0 e 2,0mL, nos TE 24 e 48h, ocorreu aumento da proliferação celular quando se comparou o índice de divisão dos dois TE com o índice mitótico dos seus respectivos controles. Para as doses de 3,0 e 4,0mL o IM obtido para os dois TE analisados foram significativamente menor ao IM observados para os seus respectivos controles. Já as quatro doses avaliadas do aromatizante sabor Queijo Cheddar não alteraram o índice de divisão celular quando comparados ao índice de divisão dos seus respectivos controles. O aromatizante de Manteiga em nenhuma dose testada, promoveu um número de aberrações celulares significativa. Diferentemente, o aromatizante sabor Queijo Cheddar, nas quatro doses testadas, ocasionou número de aberrações celulares significativa aos meristemas de raízes de cebola, com destaque as amplificações. Portanto, para as quatro doses, nas condições analisadas, o aromatizante sabor Manteiga mostrou potencial em alterar o índice de divisão celular, enquanto que o aromatizante sabor Queijo Cheddar teve ação genotóxica as células do sistema teste utilizado.

PALAVRAS-CHAVE: aberrações celulares; aditivo alimentar; divisão celular; sistema-teste vegetal.

ABSTRACT

This study aimed to evaluate the toxicity of synthetic but identical to natural food in Butter and Cheddar Cheese, at doses of: 1,0; 2,0; 3,0 and 4,0 mL, and the exposure times (ET) of 24 and 48 hours. For each dose evaluation, it was used a group of five onion bulbs, which were first embedded in distilled water and then transferred to their respective solutions. The rootlets were collected and fixed in acetic acid (3:1) for 24 hours. The slides were prepared by the crushing technique and stained with 2% acetic orcein. Cells were analyzed throughout the whole cell cycle, totaling 5,000 for each control and exposure time. The calculated mitotic rates and cellular aberrations were subjected to statistical analysis using the chi-square test ($p < 0.05$). From the results, it was observed that for the Butter flavoring in doses of 1,0 and 2,0 mL, in the time exposures of 24 and 48 h, there was an increase in cell proliferation when comparing the rate of division of the two exposure times with the mitotic rate of their respective controls. For doses of 3,0 and 4,0 ml, the mitotic rate obtained for both time exposures observed were significantly lower than the mitotic rate analyzed to their respective controls. Therefore the four doses evaluated of the Cheddar Cheese flavor did not alter the rate of cell division when compared to the rate of division of their respective controls. The Butter flavor in any tested dose promoted a significant number of cellular aberrations. Otherwise, on the Cheddar Cheese flavor, the four doses tested, brought significant number of cellular aberrations to onion roots meristems, especially the amplifications. Therefore, for the four doses, under the conditions studied, the Butter flavoring showed potential to alter the rate of cell division, while the Cheddar Cheese flavoring had genotoxic action to the cells of the test system used.

KEYWORDS: cellular aberrations; cell division; food additive; plant test system.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 01 - Classes de Aditivos Alimentares	14
Figura 01 – Imagem com as principais aberrações encontradas nos tratamentos feitos com os aromatizantes	24

LISTA DE TABELAS

- Tabela 01** – Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa* tratadas com 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL dos aromatizantes alimentares sabores Manteiga nos TE 24 e 48 horas..... 20
- Tabela 02** – Número de células que possuem pontes em anáfase e telófases e células micronucleadas, e o total de aberrações cromossômicas presentes nas células do tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com água e aromatizantes alimentares sabores Manteiga nos TE 24 e 48 horas 21
- Tabela 03** - Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa* tratadas com 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL do aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar nos TE 24 e 48 horas..... 23
- Tabela 04** - Número de pontes anafásicas e telofásicas, células micronucleadas, metáfases colchícinicas, ampliações e total de aberrações celulares encontradas em cada controle e nas doses de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL de aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar 23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	12
2 REFERENCIAL TEÓRICO	14
3 MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 <i>Obtenção dos aromatizantes alimentares e definição das concentrações</i>	18
3.2 <i>Obtenção de células meristemática para a análise citogenética</i>	18
3.3 <i>Preparo e leitura das lâminas, e análise dos dados</i>	19
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	20
5 CONCLUSÃO	26
REFERÊNCIAS	27

1 INTRODUÇÃO

Os aromatizantes alimentares são aditivos com propriedades aromáticas e/ou sápicas, capazes de conferir ou reforçar o aroma e o sabor dos alimentos sem o propósito de nutrir (CONSTANT et al., 2007). São de grande importância para a indústria alimentícia por sua capacidade aromatizante, baixo custo e tempo de permanência nos alimentos (TONETTO et al., 2008). Sua formulação é constituída de diluentes, antioxidantes, antiespumantes, conservantes, emulsificantes, estabilizantes, reguladores de acidez, realçadores de sabor, antiemectantes, antiaglutinantes, corantes, e de solventes de extração e processamento, aprovados para uso em âmbito mundial pela *European Food Safety Authority* (EFSA), e nacionalmente pela ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2005).

No entanto, os aromatizantes são considerados um avanço polêmico da indústria de alimentos por muitos especialistas da área de saúde que alegam que os mesmos juntamente com os corantes alimentares contribuem de forma significativa para o empobrecimento da dieta e para o desencadeamento e potencialização de patologias, principalmente em crianças (CHEESEMAN, 2012).

Corroborando a citação de Cheeseman (2012), a ANVISA (2007) relata que doses elevadas de aromatizantes alimentares podem provocar ações irritantes e narcóticas ao organismo. Também podem produzir toxicidade crônica ao trato digestório a longo prazo, sempre que utilizados de maneira indiscriminada. No entanto, este órgão regulamentador não informa quais são os limites de ingestão diária ideais para estes aditivos e quais doses são consideradas elevadas ao organismo.

Assim, pesquisadores brasileiros, como Tonetto et al. (2008), alertam que a utilização de aromatizantes, principalmente os sintéticos, suscita uma série de dúvidas quanto a sua toxicidade em nível sistêmico e celular. Dessa forma, torna-se importante realizar trabalhos, em sistemas testes diferentes, que avaliem a toxicidade, como por exemplo a nível celular, dos aromatizantes alimentares sintéticos, fato este que corrobora ao apelo da própria ANVISA (2007) de que deve ser constante o aperfeiçoamento da segurança sobre a utilização de aditivos na constituição de alimentos.

Os bioensaios com plantas têm sido considerados bastantes sensíveis no monitoramento dos efeitos citotóxicos de compostos químicos (USEPA) (IGANCI et al., 2006) e a *Allium cepa* (cebola) tem sido indicada como um eficiente organismo-teste vegetal para avaliação de toxicidade em nível celular (CARITÁ; MARIN-MORALES, 2008) em função, entre outras características, de suas propriedades cinéticas de proliferação, por possuir

cromossomos grandes e em número reduzido ($2n=16$), o que facilita a sua análise na detecção de danos à estrutura da molécula de DNA (MATSUMOTO et al., 2006; HERRERO et al., 2012) e na verificação de alterações no índice de divisão celular (índice mitótico), como aumento ou redução da proliferação das células de tecidos que estão em exposição a compostos químicos de interesse (TABREZ et al., 2011). Além disso, demonstram similaridade satisfatória aos resultados obtidos com outros bioensaios como os realizados com animais e em cultura de células (ARUNG et al., 2011; NUNES et al., 2011; GERAS'KIN et al., 2011).

Nesse contexto, este trabalho teve por objetivo avaliar a toxicidade em nível celular de dois aromatizantes alimentares sintéticos salgados, idênticos aos naturais, de sabores Manteiga e Queijo Cheddar, utilizados na confecção de pipocas de micro-ondas, biscoitos, bolachas e pães e amplamente comercializados na América do Sul, em células meristemáticas de raízes de *Allium cepa* L.

2 REFERENCIAL TEÓRICO

De acordo com Cunha (2008), aditivo alimentar é considerado pela legislação brasileira como uma substância intencionalmente adicionada ao alimento com a finalidade de conservar, intensificar ou modificar suas propriedades, desde que não prejudique seu valor nutritivo.

Lima (2011) afirma que os aditivos alimentares, embora sejam muitas vezes imprescindíveis em certos produtos, mostram-se como os principais responsáveis pelos danos à saúde, sobretudo quando ingeridos diariamente em grandes quantidades nos alimentos que os contém, ou quando os alimentos em que estão contidos apresentam quantidades superiores ao recomendado pelas autoridades ligadas à alimentação e a saúde. Esta mesma autora também assegura que diversos estudos apontam reações adversas aos aditivos, como reações tóxicas ao metabolismo gerando quadros graves de alergia e carcinogenicidade.

Segundo Valsechi (2001), os aditivos alimentares desempenham múltiplas e inúmeras funções destacando-se principalmente as do quadro abaixo:

Quadro 01 – Classes de Aditivos Alimentares.

Classe de aditivo	Função
Corantes	Coloração dos produtos
Aromatizantes (ou flavorizantes)	Alteração do aroma/sabor
Edulcorantes	Adoçar produtos mesmo em pequena quantidade
Conservantes	Ajudar os produtos a ter maior durabilidade
Antioxidantes	Evitar que óleos e gorduras dos alimentos combinem com 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 homogênea de ingredientes como óleo e água, por exemplo, que normalmente se separariam
Umectantes	Manter húmidos os alimentos evitando o seu ressecamento;
Acidulantes	Aproximar o sabor dos produtos da acidez da fruta que dá nome ao produto
Antiespumíferos	Evitar a formação de espumas em alimentos líquidos, durante seu processo de fabricação, ou produto final

Fonte: VALSECHI, 2001.

Em adição, a ANVISA (2007) considera que há a necessidade de constante aperfeiçoamento das ações de controle sanitário na área de alimentos, visando a proteção da saúde da população, além da necessidade de segurança de uso de aditivos alimentares na fabricação de alimentos. Somando-se a isso, o uso dessas substâncias deve ser limitado a

alimentos específicos, em condições específicas e ao menor nível para alcançar o efeito desejado, por isso é necessário atualizar a regulamentação sobre o uso de aditivos, como por exemplo, a dos aromatizantes em alimentos.

Na visão de Lima (2001), estes compostos são geralmente agrupados como *saborizantes* ("flavorizantes"), que são agentes capazes de conferir ou ressaltar o sabor, compreendendo dois grandes grupos: os essências naturais e os essências artificiais.

A essência natural, óleo essencial ou óleo etéreo, é o produto aromático, sávido, volátil e oleoso, extraído de vegetais, enquanto que o extrato vegetal aromático é um produto aromático e agradável ao paladar, obtido de plantas. Essência artificial é constituída por substâncias artificiais aromáticas, contendo ou não substâncias extraídas de vegetais. No caso das essências artificiais ou dos aromatizantes sintéticos é de suma importância a inserção no rótulo do produto a declaração "Aromatizado artificialmente", porém não é obrigatória a informação sobre qual a substância química utilizada. Neste caso, tomando como exemplo um suco com sabor de abacaxi, no rótulo informará somente que é "Aromatizado artificialmente", sem especificar qual a substância química que conferiu o aroma ou o sabor do abacaxi ao suco (LIMA, 2011).

Como descrito também por Valsechi (2001), o aroma utilizado deve aparecer no rótulo por extenso, como por exemplo: Aroma Natural de Café, Aroma Artificial de Morango, Aroma Natural Reforçado de Queijo Tipo Parmezão, etc. Nesta classe de aditivos é onde existem o maior número de substâncias, uma vez que os aromas mostram-se muito complexos. Alguns produtos podem apresentar naturalmente mais de mil substâncias com o objetivo de conferir apenas único aroma característico. Como exemplo podemos citar o Aroma Natural de Café. O café torrado apresenta um aroma tão complexo que já se identificaram mais de mil componentes na sua constituição (VALSECHI, 2001).

Atualmente, estão catalogadas mais de 30 substâncias simples voláteis que apresentam características que podem ser utilizadas para compor os mais variados aromas que existem na natureza. O mel apresenta um aroma composto de mais de 200 aromas individuais; a maçã apresenta em seu aroma mais de 130 componentes individuais e voláteis (VALSECHI, 2001).

Assim, por sua formulação química complexa os aromatizantes são considerados um avanço polêmico da indústria de alimentos por muitos especialistas da área de saúde que alegam que estes juntamente com os corantes alimentares contribuem de forma significativa para o empobrecimento da dieta e para o desencadeamento e potencialização de patologias, principalmente em crianças, levantando uma série de dúvidas quanto a sua toxicidade em nível sistêmico e celular (SILVA; NEED, 2010; CHEESEMAN, 2012).

Estudos recentes demonstraram que os aromatizantes alimentares podem ser bastante tóxicos quando utilizados por tempo prolongado, promovendo hiperatividade em crianças com e sem déficit de atenção (STEVENS et al., 2013), diminuição significativa na concentração de hemoglobina no sangue, alterações drástica no funcionamento do fígado, diminuição significativa no peso de camundongos (HANAN; MONAN, 2013), alergias, hipersensibilidade cutânea, indigestão em humanos (ANDERSON et al., 2013).

Prado e Godoy (2003) reafirmam que o Comitê conjunto FAO/OMS de peritos em aditivos alimentares, JECFA (*Joint Expert Committee on Food Additives*), em nível internacional, recomenda que cada país verifique periodicamente o consumo total de cada aditivo, com base em estudos de dieta e toxicidade.

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

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

O crescimento de muitas raízes é aparentemente um processo contínuo que para somente em condições adversas como seca e baixas temperaturas. O ápice da raiz é coberto por uma coifa, que é uma massa de células semelhantes a um dedal, que protege o meristema apical, localizado internamente a ela. O meristema apical é composto por células relativamente pequenas e multifacetadas com citoplasma denso e núcleos grandes. A região meristemática apical da raiz é mitoticamente ativa durante seu desenvolvimento e possuem uma curta distância entre a região inativa do meristema apical (centro quiescente) (RAVEN, 2010).

O uso de Sistema Teste Vegetal como modelo biológico, *Allium cepa*, para investigar genotoxicidade em conservantes alimentares propõe a demonstração de que essas substâncias sintéticas atuam no ciclo celular alterando assim o tempo de proliferação das células. Esse

modelo experimental é bastante prático devido à simplicidade e aos custos baixos. Além disso, é muito importante demonstrar o efeito dos conservantes 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 eles estão expostos (AIUB; FELZENSZWALB, 2011).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Vegetal e Animal (NUPBSAM) do Campus Senador Helvídio Nunes de Barros da Universidade Federal do Piauí, Município de Picos, Estado do Piauí, no período de outubro de 2013 a fevereiro de 2014.

3.1 Obtenção dos aromatizantes alimentares e definição das concentrações

Os aromatizantes alimentares sintéticos salgados e líquidos, idênticos ao natural, de sabores Manteiga e Queijo Cheddar foram adquiridos de uma revendedora especializada na comercialização nacional e internacional de aditivos alimentares sintéticos localizada na região Nordeste do Brasil. Os aromatizantes, de aspecto oleoso, estavam acondicionados em frascos âmbar com capacidade para 100mL. Todos os produtos estavam dentro do prazo de validade. Em seus rótulos recomendava-se aplicar 3,0mL de aromatizante em 1Kg de massa. Neste trabalho, as doses estabelecidas foram de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL.

3.2 Obtenção de células meristemáticas de raízes de A. cepa para a análise citogenética

As cebolas foram colocadas para enraizar em frascos com água destilada, à temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$) e aerada, até a obtenção de raízes com cerca de 2,5 cm de comprimento. Para análise de cada dose (solução) estabeleceu-se um grupo experimental com cinco bulbos de cebola.

Antes de se colocar as raízes em contato com as suas respectivas doses, algumas raízes foram coletadas e fixadas para servirem de controle (CO) do próprio bulbo. Em seguida, as raízes restantes foram colocadas em suas respectivas soluções, por 24 horas, procedimento este denominado de tempo de exposição de 24 horas (TE 24h).

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

No frasco de cada bulbo em estudo foram colocados a quantidade de 1,0, 2,0, 3,0 e 4,0mL de sua respectiva dose de aromatizante, tendo-se o cuidado de verificar se todas as raízes estavam em contato adequado com a solução em estudo. A fixação das raízes se deu em Carnoy 3:1 (etanol: ácido acético), a temperatura ambiente, por 24 h. Para cada coleta de raiz, retirou-se, em média, três raízes por bulbo.

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

3.3 Preparo e leitura das lâminas, e análise dos dados

As lâminas, em média 03 por bulbo, foram feitas seguindo o protocolo proposto por Guerra & Souza (2002). Cada lâmina foi corada com duas gotas deorceína acética a 2% e analisada em microscópio óptico, em objetiva de 40X. Para cada bulbo analisou-se 1.000 células, totalizando 5.000 células para cada controle e tempo de exposição.

Foram observadas células em interfase, prófase, metáfase, anáfase e telófase. Foi calculado o número de células em interfase e em divisão de cada controle e tempo de exposição e determinando o índice mitótico. Avaliou-se também a ação das doses por meio do número de células micronucleadas, de metáfases colchicínicas, pontes anafásicas e telofásicas, ampliações gênicas, células com aderências, brotos nucleares e anáfases multipolares. A análise estatística dos dados foi realizada pelo teste do Qui-quadrado (χ^2), com nível de probabilidade <0.05 , por meio do software estatístico BioEstat 3.0 (2007).

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 01, é apresentado o número de células em interfase e em diferentes fases da divisão celular e os valores de índice mitóticos obtidos a partir de células de tecido meristemático de raízes de *Allium cepa* tratadas com água e com aromatizante alimentar sabor Manteiga nos TE 24 e 48 horas. Na descrição dos resultados também são mostrados os valores significativos de χ^2 .

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

Aromatizante	TE	Células em Interfase	Células em Divisão	IM (%)
Manteiga	CO	4.464	536	10,7 ^a
1,0mL	24h	3.711	1.289	25,8 ^b
	48h	3.612	1.388	27,7 ^b
Manteiga	CO	4.381	619	12,4 ^a
2,0ml	24h	3.892	1.108	22,2 ^b
	48h	3.830	1.170	23,4 ^b
Manteiga	CO	4.633	367	7,3 ^a
3,0ml	24h	4.819	181	3,6 ^b
	48h	4.805	195	3,9 ^b
Manteiga	CO	4.737	263	5,3 ^a
4,0ml	24h	4.899	101	2,0 ^b
	48h	4.902	98	1,9 ^b

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

Na Tabela 02, é apresentado o número de células que possuem pontes em anáfases e telófases, células micronucleadas, metáfases colchicínicas, ampliações e o total de aberrações celulares presentes nas células do tecido meristemático de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com o aromatizante alimentar sabor Manteiga nos TE 24 e 48 horas

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

Aromatizante/dose	Tempo de Exposição	Pontes Anafásica e Telofásicas	Células Micronucleadas / Micrócito	Metáfase Colchicínica	Amplificações	Total de Aberrações Celulares
Manteiga 1,0mL	CO	0	0	0	0	0
	TE 24h	0	0	0	0	0
	TE 48h	0	0	0	0	0
Manteiga 2,0mL	CO	0	0	0	0	0
	TE 24h	0	0	0	0	0
	TE 48h	0	0	0	0	0
Manteiga 3,0mL	CO	0	0	0	0	0
	TE 24h	0	0	0	0	0
	TE 48h	1	0	0	5	6
Manteiga 4,0mL	CO	0	0	0	0	0
	TE 24h	3	0	0	8	11
	TE 48h	0	0	0	0	0

TE – Tempo de Exposição; CO – Controle;

A partir dos resultados obtidos para o aromatizante alimentar de Manteiga (Tabela 01) pode se verificar que nas doses de 1,0 e 2,0mL, nos TE 24 e 48h, houve um aumento significativo no índice de divisão celular dos mesmos quando comparado ao IM dos seus respectivos CO. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os IM do TE 24 e 48h das duas doses em questão. Diferentemente, nas doses de 3,0 e 4,0mL deste aditivo (Tabela 01), nos TE 24 e 48h, houve uma redução estatisticamente significativa do índice de divisão celular ($p < 0,05$) em relação aos índices mitóticos dos seus respectivos controles. Aqui para estas duas doses também não foi observado diferença estatisticamente significativa entre os IM do TE 24 e 48h.

Tanto nas doses de 1,0 e 2,0 como nas de 3,0 e 4,0mL deste aromatizante ocorreu toxicidade às células meristemáticas de raízes de *A. Cepa*. Porém, diferentemente das duas primeiras que promoveram efeito proliferativo, a de 3,0 e 4,0mL reduziram o índice de divisão celular, ou seja, ocasionaram um efeito antiproliferativo, em torno de 50%. Já na tabela 02 é possível observar que nenhuma das concentrações avaliadas causaram um número de aberrações celulares.

Segundo Cavalcanti et al. (2012), o composto Diacetil (2,3-butanodiona), um diluente presente em grande quantidade nas composição química do aromatizante de Manteiga, causa bronquiólite obliterante, patologia muito comum em trabalhadores de fábricas de pipoca de microondas, que obstrui os bronquíolos comprometendo amplamente o funcionamento dos pulmões. Whittaker et al. (2008) avaliaram o potencial mutagênico deste composto químico em um ensaio de mutação gênica utilizando células de linfoma de rato, linhagem L5178Y, e

verificaram que o Diacetil causou danos significativos a loci do cromossomo 11 destas células, além de ocasionar a perda funcional do locus para a enzima timidina-quinase. Também observaram que quanto maior a concentração de Diacetil maior era o efeito antiproliferativo.

Ainda, More et al. (2012) relata que altas concentrações de Diacetil são mutagênicas em função de terem o potencial de substituir bases de timinas por guaninas. Esta mudança tem a propriedade de romper as pontes de hidrogênio e de dissulfeto da estrutura terciária de proteínas, como das enzimas envolvidas no processo de divisão celular. Uma vez a estrutura terciária desfeita a proteína perde função. Assim, os resultados obtidos por Whittaker et al. (2008) e More et al. (2012) podem explicar os resultados obtidos neste trabalho para as doses de 3,0 e 4,0mL de aromatizante de Manteiga, no qual foi verificado uma diminuição significativa do índice mitótico, nos dois TE avaliados, em relação aos seus respectivos controles.

No entanto, de acordo com Potera (2012), em camundongos, baixas concentrações de Diacetil mostrou ter a propriedade de estimular a proliferação de fibroblasto nos pulmões destes animais em função de aumentar a expressão de genes responsáveis pela produção das citocinas. Este resultado corrobora aos resultados obtidos aqui onde as menores doses avaliadas, 1,0 e 2,0mL, estimularam um aumento significativo da proliferação celular nas células meristemáticas de raízes de *A. cepa*.

Os estudos de avaliação de toxicidade em nível celular sobre o aromatizante alimentar sabor Manteiga realizados por Whittaker et al. (2008), More et al. (2012) e Potera (2012) foram os únicos encontrados na literatura científica. Assim, é de grande importância que outros estudos sejam conduzidos para se estabelecer, com propriedade, doses seguras de utilização deste aditivo para as indústrias alimentícias e, conseqüentemente, para a população.

Na Tabela 03, é apresentado o número de células em interfase e em diferentes fases da divisão celular e os valores de índice mitóticos obtidos a partir de células de tecido meristemático de raízes de *A. cepa* tratadas com água e com aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar nos TE 24 e 48 horas. Também são mostrados os valores significativos de χ^2 .

Tabela 03 - Número total de células analisadas no ciclo celular de pontas de raízes de *Allium cepa* tratadas com 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL do aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar nos TE 24 e 48 horas.

Aromatizante	TE	Células em Interfase	Células em Divisão	IM (%)
Queijo Cheddar 1,0mL	CO	4.756	244	4,9 ^a
	24h	4.710	290	5,8 ^a
	48h	4.703	297	5,9 ^a
Queijo Cheddar 2,0mL	CO	4.773	227	4,5 ^a
	24h	4.749	251	5,0 ^a
	48h	4.698	302	6,0 ^a
Queijo Cheddar 3,0mL	CO	4593	407	8,1 ^a
	24h	4607	393	7,9 ^a
	48h	4738	262	5,2 ^a
Queijo Cheddar 4,0mL	CO	4678	322	6,4 ^a
	24h	4610	390	7,8 ^a
	48h	4687	313	6,3 ^a

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

Na Tabela 04, é apresentado o número de células que possuem pontes em anáfases e telófases, células micronucleadas, metáfases colchicínicas, ampliações e o total de aberrações celulares presentes nas células do tecido meristemático de raízes de *A. cepa* tratadas com água e aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar nos TE 24 e 48 horas.

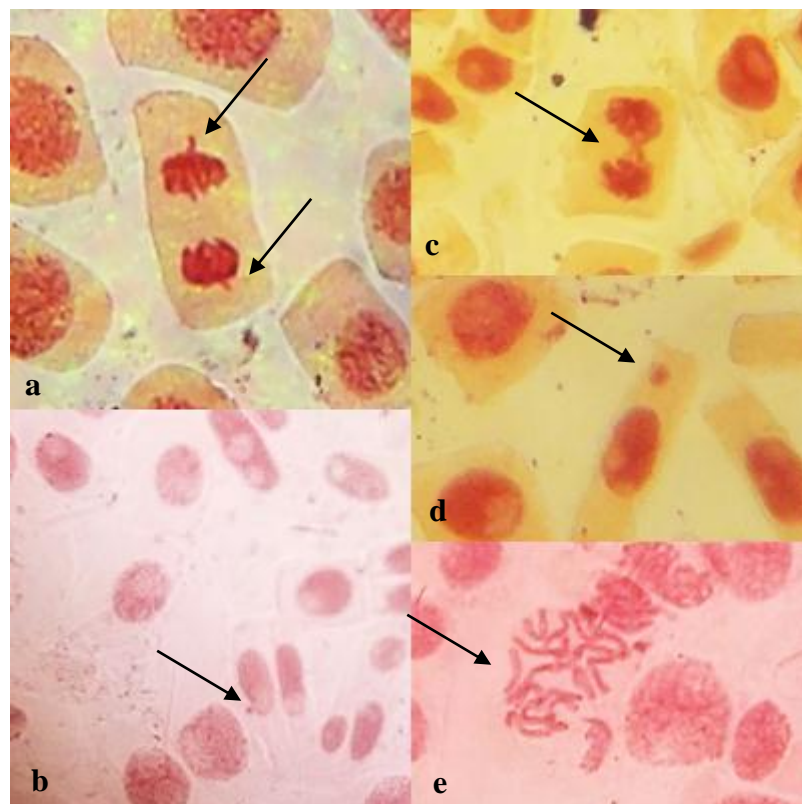
Tabela 04 - Número de pontes anafásicas e telofásicas, células micronucleadas, metáfases colchicínicas, ampliações e total de aberrações celulares encontradas em cada controle e nas doses de 1,0; 2,0; 3,0 e 4,0mL de aromatizante alimentar sabor Queijo Cheddar.

Aromatizante/dose	TE	Pontes Anafásica e Telofásica	Célula Micronucleada	Metáfase Colchicínica	Amplificações	Total de Aberrações Celulares
Queijo Cheddar 1,0mL	CO	0	0	1	0	01 ^a
	24h	1	8	1	140	150 ^b
	48h	0	0	0	0	0 ^a
Queijo Cheddar 2,0mL	CO	0	0	1	0	01 ^a
	24h	0	0	1	114	115 ^b
	48h	3	1	1	139	144 ^b
Queijo Cheddar 3,0mL	CO	1	0	1	10	12 ^a
	TE 24h	6	0	1	126	133 ^b
	TE 48h	2	0	1	124	127 ^b
Queijo Cheddar 4,0mL	CO	3	0	1	3	07 ^a
	24h	6	2	1	149	158 ^b
	48h	4	3	1	139	147 ^b

TE – Tempo de Exposição; CO – Controle; Médias seguidas pela mesma letra não diferem significativamente ao nível de 5% pelo teste χ^2 .

Como pode ser observado na Tabela 03, nenhuma das quatro doses testadas do aromatizante Queijo Cheddar alteraram o índice de divisão celular, nos dois TE avaliados, das células meristemáticas de raízes de *A. cepa* quando comparados ao IM dos seus respectivos controles. Também não houve alteração significativa quando comparado os IM dos TE 24 e 48h de todas as doses estudadas. Já na Tabela 04 mostra que todas as doses ocasionaram um número estatisticamente significativo de aberrações celulares as células do sistema teste em questão, com grande ênfase a alteração do tipo amplificação. Portanto, nas condições analisadas, as doses do aromatizante de Queijo Cheddar foram genotóxicas ao sistema teste utilizado.

Figura 01 – Prancha com as principais aberrações encontradas nos tratamentos feitos com os aromatizantes.



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

Não foram encontrados na literatura científica trabalhos avaliando a citotoxicidade, mutagenicidade e carcinogenicidade do aromatizante alimentar de Queijo Cheddar. Porém, existem poucos trabalhos realizados na década de 80 avaliando a toxicidade celular de aromatizante de Queijo. Os resultados destas pesquisas são contraditórios onde alguns mostraram citotoxicidade e mutagenicidade, e outros evidenciaram que este tipo de

aromatizante possui ação citotóxica. Assim, pelos resultados obtidos aqui para o aromatizante Queijo Cheddar é de grande importância, para que outros estudos sejam conduzidos, principalmente em sistema-teste animal e em cultura de células tumorais e normais para se somar a este e assim avaliar como propriedade o potencial genotóxico deste aditivo alimentar.

É importante destacar que a indústria de alimentos é umas das interfaces da economia que mais cresce no mundo, gerando uma grande competitividade entre os produtores, que estão em busca de atender às novas demandas dos consumidores. Para isso, procuram produzir alimentos atrativos do ponto de vista higiênico, nutricional e sensorial. Todavia, com o objetivo de torná-los competitivos, vêm utilizando cada vez mais os aditivos alimentares.

Dessa forma, visto que os aromatizantes alimentares são classificados como aditivos e, portanto, estão diretamente relacionados a promoção do sabor dos alimentos, os órgãos fiscalizadores competentes devem apresentar padrões rigorosos para avaliar e liberar a utilização desses, pois o consumo pode estar associado a danos irreversíveis à saúde do consumidor. No momento, aproximadamente 2.700 aromatizantes para alimentos estão disponíveis no mercado. Assim, a presença de diferentes aromatizantes em alimentos justifica o interesse e a necessidade permanente de se avaliar a inocuidade dos mesmos, bem como regulamentar de forma precisa o seu uso.

5 CONCLUSÃO

Para as quatro doses, nas condições analisadas, o aromatizante sabor Manteiga mostrou potencial em alterar o índice de divisão celular, enquanto que o aromatizante sabor Queijo Cheddar teve ação genotóxica em células de *Allium cepa*.

REFERÊNCIAS

- AIUB, C.A.F.; FELZENSZWALB, I. O uso de *Allium cepa* como modelo experimental para investigar genotoxicidade de substâncias usadas em conservantes alimentares. **Genética na Escola**, Rio de Janeiro, v.1, n.06, p.12-15, 2011.
- ANTUNES, L.M.G.; ARAÚJO, M.C.P. Mutagenicidade e Antimutagenicidade dos principais corantes para alimentos. **Ver. Nutr.**, Campinas, v.2, n.13, p.81-88, 2000.
- ARUNG, E. T. et al. Melanin biosynthesis inhibitory and antioxidant activities of quercetin-3'-O-beta-D-glucose isolated from *Allium cepa*. **Zeitschrift fur Naturforschung C Journal of biosciences**. v.66, n. 5/6, p. 209-14, 2011.
- BRASIL, ANVISA. **Resolução da Diretoria Colegiada-RDC nº. 217, de 29 de Julho de 2005**. Disponível em <<http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2005/rdc/21705rdc.pdf>>. Acesso em: 08 fev, 2014.
- BRASIL, ANVISA. **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: 08 fev, 2014.
- CARITÁ, R.; MARIN-MORALES, M. A. Induction of chromosome aberrations in the *Allium cepa* test system caused by the exposure of seeds to industrial effluents contaminated with azo dyes. **Chemosphere**. England. v.72, p.722-725, 2008.
- CAVALCANTI, Z. R. et al. Bronquiolite associada à exposição a aroma artificial de manteiga em trabalhadores de uma fábrica de biscoitos no Brasil. **J. bras. pneumol**. v.38, no.3, São Paulo, 2012.
- COSTANT, P. B. L.; STRINGUETA, P. C.; SANDI, D. Corantes alimentícios. **B. CEPPA**, v. 20, n. 2, p. 203-220, 2007.
- CHEESEMAN, M. A. Artificial food color additives and child behavior. **Environmental Health Perspectives**. v. 20, p.15-16, 2012.
- CUNHA, F. G. **Estudo da Extração Mecânica de Bixina das Sementes de Urucum em Leito de Jorro**. 2008. 92 f. Dissertação (Mestre em Engenharia Química) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2008.
- GERAS`KIN, S. et al. Genotoxicity assay of sediment and water samples from the Upper Silesia post-mining areas, Poland by means *Allium* test. **Chemosphere**. v.83, n. 8, p.1133-1146, 2011.
- HERRERO, O. et al. Toxicological evaluation of three contaminant of emerging concern by use of *Allium cepa* test. **Mutation Research**, v.743, n. 1-2, p.24-34, 2012.

IGANCI, J. R. V. et al. Efeito do extrato aquoso de diferentes espécies de boldo sobre a germinação índice mitótico de *Allium cepa* L. **Arquivos do Instituto de Biologia**, v.73, p. 79-82, 2006.

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

MATSUMOTO, S. T. et al. Genotoxicity and mutagenicity of water contaminated with tannery, as evaluated by the micronucleus test and comet assay using the fish *Oreochromis niloticus* and chromosome aberration in onion root-tips. **Genetics and Molecular Biology**. v.29, p. 148-58, 2006.

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

PRADO, M. A.; GODOY, H. T. Corantes artificiais em alimentos. **Alim. Nutr.** Araraquara, v.14, n.2, p. 237-250, 2003.

RAVEN, H.P.; EVERT, R.F.; EICHHORN, S.E. 2010. **Biologia Vegetal**. 5 ed. Rio de Janeiro, Ed Guanabara Koogan.

TABREZ, S. et al. Genotoxicity testing and biomarker studies on surface water: an overview of the techniques and their efficacies. **Environmental Carcinogenesis Ecotoxicology Review**, v.29, n. 3, p.250-75, 2011.

TONETTO, A. et al. **O Uso de Aditivos de Cor e Sabor em Produtos Alimentícios**. 2008. 21 f. Texto de apoio (Especialização em Atividade Física Adaptada e Saúde) – Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

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

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 Chem Toxicol**. v. 46, n.8, p. 2928-33, 2008.